

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月12日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/25427 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/435,
16/18, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 38/00, 39/395,
48/00, A61P 9/10, G01N 33/50, 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06840

(22) 国際出願日: 2000年10月2日 (02.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/280976 1999年10月1日 (01.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番
1号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 野島 博 (NOJIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒562-
0031 大阪府箕面市小野原東六丁目35-24 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉末 元
(YOSHISUE, Hajime) [JP/JP]. 大林正也 (OBAYASHI,
Masaya) [JP/JP]. 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP].
川端彩子 (KAWABATA, Ayako) [JP/JP]. 桜田一洋
(SAKURADA, Kazuhiro) [JP/JP]. 関根 進 (SEKINE,
Susumu) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町三

丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所
内 Tokyo (JP). 久我哲郎 (KUGA, Tetsuro) [JP/JP]; 〒
747-8522 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工
業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP). 中村祐輔
(NAKAMURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県
横浜市青葉区あざみ野一丁目17-33 Kanagawa (JP). 菅
野純夫 (SUGANO, Sumio) [JP/JP]; 〒167-0052 東京都
杉並区南荻窪四丁目8-13 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: SHEAR STRESS-RESPONSE DNA

(54) 発明の名称: ずり応力応答性DNA

(57) Abstract: A novel shear stress-response DNA; a protein encoded by this DNA; an antibody against this protein; a method of detecting a shear stress-response DNA or protein; remedies and diagnostics for vascular diseases caused by arteriosclerosis; and a method of screening a drug for treating or diagnosing these diseases.

(57) 要約:

この発明は、新規のずり応力応答性DNA、そのDNAによってコードされる蛋白質、その蛋白質に対する抗体、ずり応力応答性DNAまたは蛋白質を検出する方法、ならびに、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬および診断薬、およびそのような治療または診断のための薬剤のスクリーニング法に関する。

WO 01/25427 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ずり応力応答性DNA

発明の分野

本発明は、血管内皮細胞においてずり応力依存的に発現が上昇する mRNA に注目し、サブトラクション法を用いて取得した新規 DNA および該 DNA がコードする蛋白質に関する。また、該蛋白質に対する抗体、該蛋白質および該 DNA の検出方法、ならびに動脈硬化を原因とする種々の血管病、例えば心不全、PTCA（経皮的経管的冠動脈形成術）後の再狭窄、高血圧などの疾患の診断および治療、およびそのような治療または診断のための薬剤のスクリーニング法に関する。

発明の背景

血管の内面を一層に覆う血管内皮細胞は、従来、血管内腔を流れる血液と組織とを隔てる単なる内張りと考えられてきた。しかし、近年の血管内皮に関する研究が進展した結果、内皮には生体にとって非常に重要な多彩な機能が備わっていることがわかってきた。それらの機能とは例えば、血液と組織間の物質透過性の調節、血管の緊張度の調節、抗血栓活性の維持、平滑筋増殖制御、組織修復、炎症反応、血管のリモデリングなどである。血流が血管壁に与える物理力のことをずり応力と呼び、血流速度と血液の粘性、および血管の径や形態によって規定される。ずり応力は血管壁の内面を覆っている内皮に働き、血管内皮細胞を血流の方向に歪ませる。この物理的刺激が、ホルモン、サイトカインなどの化学的刺激と同様、血管内皮細胞の形態や、上述したような様々な機能の調節に深く関与していることが、ここ約10年の研究で明らかになってきた〔細胞工学、16、950（1997）〕。

粥状動脈硬化症は日本を含む先進工業国において、成人死因の主要な

原因の一つである。高コレステロール血症、高ホモシステイン血症、糖尿病などの原因で起こる血管の機能不全は粥状動脈硬化の発症ならび病態の悪化と深く関係していることが知られている〔Molecular Cardiovascular Medicine, 49-61 (1995)〕。一方、動脈硬化巣は血管全体に均一に分布するのではなく、例えば血管の分岐部の曲がりの外側など特定の部位に局在することが知られている。このような局所性の発症は、血中コレステロールを遺伝的に増加させた実験動物でも観察されることから、血管内皮へのコレステロールの取り込みが血管内皮細胞の局所的な変化ならびにコレステロールの具体的な取り込みの2段階で起こると考えられている〔Arterioscler. Thromb., 14, 133-140 (1994)〕。このような局所的な発症の原因はほとんど明らかにされていない。しかし、初期病変がずり応力の強さや方向が非定常となっている場所即ち、ずり応力が低く、かつ流れの剥離や停滞あるいは渦などの乱流が起きやすい場所で多発することから、ずり応力などの血行力学的応力が粥状動脈硬化症の発症に深く関係すると考えられている。現在、ずり応力がどのような分子機構で動脈硬化を局所的に惹起させるかは明らかではない。しかし、現在までに試験管内で培養した血管内皮細胞に機械的にずり応力を与えることで変動する遺伝子が探索され、ずり応力がAP (activator protein)-1、NF (nuclear factor)- κ B など種々の転写因子を活性化することにより、それらの転写因子の制御下にある遺伝子の発現が変化することが見い出されている。現在までにずり応力刺激に回答して発現が変動する遺伝子のコードする蛋白質として、PDGF (platelet-derived growth factor)、TGF (transforming growth factor)- β などの増殖因子、VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1、ICAM (intercellular adhesion molecule)-1 などの接着因子、ET (endothelin)-1 などの緊張度調節因子、t-PA (tissue-type plasminogen activator) などの血液栓溶因子、NOS (nitric oxide synthase)3, COX (cyclooxygenase)2, SOD (superoxide dismutase) などの

酵素などが報告されている [Molecular Medicine Today, 5, 40 (1999)]。このように、試験管内の再構成系において、ずり応力で応答する遺伝子には、少なくとも血管内の低ずり応力部位でずり応力の変化に伴い発現してくると考えられる動脈硬化誘導因子、ならびに血管内の構成的にずり応力の高い場所で動脈硬化の発症を抑制している分子の大きく二つの特性を持った分子が含まれると考えられる。しかし、ずり応力で発現が変動すると推定された遺伝子のなかで、具体的な遺伝子が同定されたものは一部にしかすぎない。動脈硬化の成因を理解し、予防法ならびに治療法を開発するにはずり応力で応答する未知の遺伝子を明らかにすることが必要である。近年、デファレンシャルディスプレイ法などを利用して、ずり応力で変動する未知の遺伝子の探索が行われたが、数倍程度の変動では遺伝子の取得が難しいこと、偽陽性のクローンの割合が多い等の問題点がある [Nucleic Acids Res., 23, 4520-4523 (1995)]。そのためデファレンシャルディスプレイ法により明らかにされたずり応力で変動する遺伝子の数は多くなかった [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10417-10422 (1996); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 9314-9319 (1997); Biochem. Biophys. Res. Comm., 225, 347-351 (1996); Biochem. Biophys. Res. Comm., 246, 881-887 (1998); US patent 5,834,248, (1998); US patent 5,849,578, (1998); US patent 5,882,925, (1999)]。

以上のように、血管内皮細胞に負荷されるずり応力の変化が粥状動脈硬化の局所性発症に関与することが認知されている一方で、その分子機構はほとんどわかっていないのが実状である。しかしながら、ずり応力は in vivo において内皮細胞のターンオーバーを減少させる、即ち内皮の細胞死を抑制する方向に働くことが古くから報告されている [Atherosclerosis, 17, 401-417, (1973), Circ. Res., 69, 1557-1565, (1991)]。また、in vitro において、TNF- α 刺激、過酸化水素刺激、増殖因子枯渇等により誘導された内皮細胞のアポトーシスが、ずり応力負荷により顕著に抑制されることを示す多くの報告がある [J. Exp. Med.,

185, 601-607, (1997)、FEBS Lett., 399, 71-74, (1997)、Arterioscler. Thromb. Vas. Biol., 17, 3588-3592, (1997)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 231, 586-590, (1997))。即ち、ずり応力の低い動脈の分岐部、湾曲部においては、アポトーシスが誘導される方向に内皮細胞の形質が変化し、このことが動脈硬化初期病変の局所性を規定する一因であると考えられている。しかしながら現在、内皮細胞のアポトーシスがずり応力負荷により抑制される分子機構、即ちシグナル伝達機構に關与する遺伝子についてはほとんどわかっていない。

血管内皮細胞がずり応力に応答する分子メカニズムを理解することは、動脈硬化を原因とする種々の血管病の発症機構ならびに治療のターゲットを知ることに繋がる。そのシグナル伝達機構を知るためには、血管内皮細胞においてずり応力刺激依存的に発現が変動するような遺伝子群を取得することが必要である。

また、血管内皮細胞においてずり応力刺激によりアポトーシスが抑制される分子メカニズムを理解することは、動脈硬化初期病変の局所的形成機構を明らかにし、動脈硬化を原因とする種々の血管病の治療薬を見出すことに繋がる。その分子メカニズムを知るためには、血管内皮細胞においてずり応力刺激依存的に発現が上昇し、アポトーシス抑制活性を有する遺伝子を取得することが必要である。

発明の概要

本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意研究し以下の結果を得た。即ち、ずり応力を負荷した培養血管内皮細胞由来のmRNAを鋳型として作製したcDNAライブラリーを、ずり応力を負荷しない内皮細胞より抽出したmRNAで差し引くことにより、ずり応力負荷条件下で発現が上昇する遺伝子が濃縮されたサブトラクションライブラリーを構築した。該サブトラクションライブラリーは、発現量の低い遺伝子が均一化する現象ならび挿入断片のない空のベクターが増加することから、新た

にリバースサブトラクション法を開発し、サブトラクションライブラリーからずり応力で変動する遺伝子を濃縮した第2世代のサブトラクションライブラリーを構築した。該第2世代のサブトラクションライブラリー中に存在するクローンについてランダムにノーザンハイブリダイゼーションを行い、ずり応力負荷により発現が上昇するクローンを多数取得した。該クローンの中にはすでにずり応力で変動することが知られている遺伝子に加えて、動脈硬化の調節に働くと推定される遺伝子、動脈硬化との関係が今まで知られていなかった遺伝子、および新規遺伝子を見出した。さらに該遺伝子がコードするペプチドを見出すことにより、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下の(1)～(76)を提供するものである。

(1) 配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNA。

(2) 配列番号143、145、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNA。

(3) 配列番号147で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつ該DNAと90%以上の相同性を有するずり応力応答性DNA。

(4) 配列番号143、145、149、153、155、157、168、170および172で表わされる塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNA。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載のDNAを用いてずり応力応答性遺伝子のmRNAを検出する方法。

(6) (1)～(4)のいずれかに記載のDNAを含有する、動脈硬化

を原因とする血管病の診断薬。

(7) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA を用いて動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法。

(8) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA を用いてずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

(9) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA を用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(10) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(11) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA を含む組換えウイルスベクター。

(12) (1) ~ (4) のいずれかに記載の DNA のセンス鎖と相同な配列からなる RNA を含む組換えウイルスベクター。

(13) 配列番号 111、113、115、116、117、119、121、123、125、127、129、130、131、132、133、134、135、137、139 および 141 で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する DNA。

(14) (13) に記載の DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性 DNA。

(15) 配列番号 111、113、115、116、117、119、121、123、125、127、129、130、131、132、133、134、135、137、139 および 141 で表わされる塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した 5 ~ 60 塩基と同じ配列を有する DNA または該 DNA と相補的な配列を有する DNA。

(16) (13) ~ (15) のいずれかに記載の DNA を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

(17) (13) ~ (15) のいずれかに記載の DNA を用いる、動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法。

(18) (13) ~ (15) のいずれかに記載のDNAを用いてずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

(19) (13) ~ (15) のいずれかに記載のDNAを用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(20) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、ずり応力応答性遺伝子のmRNAを検出する方法。

(21) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号7で表される塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNAを用いて、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写量を検出することにより細胞のアポトーシス感受性を同定する方法。

(22) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するDNA、あるいはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを用いて、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写もしくは翻訳を調節することにより細胞のアポトーシスを抑制または促進する方法。

(23) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、

107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

(24) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAを含有する、細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤。

(25) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

(26) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(27) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写もしくは翻訳を調節することにより細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤を、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAを用いてスクリーニングする方法。

(28) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、

43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(29) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、あるいはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを含有する、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤。

(30) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを含む組換えウイルスベクター。

(31) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。

(32) (30) または (31) に記載の組換えウイルスベクターを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(33) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えウ

イルスベクターまたは配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA のセンス鎖と相同な配列からなる RNA を含む組換えウイルスベクターを用いて細胞のアポトーシスを抑制する方法。

(34) 配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA を含む組換えウイルスベクターまたは配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA のセンス鎖と相同な配列からなる RNA を含む組換えウイルスベクターを用いて細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法。

(35) 配列番号 144、146、148、150、152、154、156、158、169、171 および 173 で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質。

(36) (35) に記載の蛋白質の有するアミノ酸配列とは 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質。

(37) (35) または (36) に記載の蛋白質をコードする DNA。

(38) (1) ~ (4) および (37) のいずれかに記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

(39) (38) に記載の組換え体 DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(40) (39) に記載の形質転換体を培地に培養し、培養液中に (35) または (36) に記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

(41) (39) に記載の形質転換体を培地に培養し、該培養物を用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(42) (35) または (36) に記載の蛋白質を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(43) (35) または (36) に記載の蛋白質を生産する組換えウイルスベクター。

(44) (43) に記載の組換えウイルスベクターを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(45) (35) または (36) に記載の蛋白質を認識する抗体。

(46) (45) に記載の抗体を用いる (35) または (36) に記載の蛋白質の免疫学的検出方法。

(47) (45) に記載の抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(48) (45) に記載の抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

(49) (45) に記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

(50) (45) に記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(51) (45) に記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化薬へ誘導するドラッグデリバリー法。

(52) 配列番号 112、114、118、120、122、124、126、128、136、138、140 または 142 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体。

(53) (52) に記載の抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(54) (52) に記載の抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制する薬剤をスクリーニングする方法。

(55) (52) に記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

(56) (52) に記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(57) (52) に記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子

の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導するドラッグデリバリー法。

(58) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と特異的に結合し細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤を、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を用いてスクリーニングする方法。

(59) 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを、宿主細胞に導入して得られる形質転換体を培地に培養し、該培養物を用いて細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法。

(60) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108および110で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白を生産する組換えウイルスベクター。

(61) (60)に記載の組換えウイルスベクターを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(62) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターを用いて、細胞のアポトーシスを抑制する方法。

(63) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターを含有する、細胞のアポトーシスを抑制する薬剤。

(64) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、

86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

(65) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法。

(66) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞のアポトーシスを調節する方法。

(67) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞のアポトーシスを調節する薬剤をスクリーニングする方法。

(68) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の発現量を検出することにより細胞のアポトーシス感受性を同定する方法。

(69) 細胞が血管内皮細胞である(21)、(22)、(27)、(33)、(34)、(58)、(59)、(62)、(66)、(67)、または(68)のいずれかに記載の方法。

(70) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、

106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

(71) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤。

(72) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

(73) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、細胞のアポトーシスを調節する薬剤。

(74) (27)、(34)、(58)、(59)または(67)のいずれかに記載の方法により得られる、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤。

(75) 細胞が血管内皮細胞である(24)、(29)、(63)、(71)、(73)、または(74)のいずれかに記載の薬剤。

(76) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導するドラッグデリバリー法。

本明細書中で使用する「調節する」という用語は、抑制または促進のいずれかの作用を意味する。また「薬剤」とは、蛋白質、核酸を含む任

意の分子量のすべての物質を指す。

本発明のDNAは動脈硬化に関連するずり応力応答性DNAであり、例えば、配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNA、および該DNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつずり応力の負荷に対して発現量が変化するDNAをあげることができる。

上記の配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1倍～2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略記する)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略記する)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことが

できる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、更に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

更に、本発明のDNAとして、本発明のDNAの一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドも含まれる。該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号143、145、147、149、151、153、155、157、168、170および172で表される塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した5～60残基、好ましくは10～40残基の塩基配列と同じ配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができ、アンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、該オリゴヌクレオチドのアンチセンス・オリゴヌクレオチドをあげることができる。

本発明の蛋白質として、動脈硬化に関連する活性を有する蛋白質をあげることができ、具体的には、配列番号144、146、148、150、152、154、156、158、169、171および173で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列とは1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質をあげることができる。

配列番号144、146、148、150、152、154、156、158、169、171および173で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質のアミノ酸配列とは1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング 第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオ

ロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

また、本発明者らは、取得した血管内皮細胞においてずり応力負荷により発現上昇する多数の遺伝子の中から、F a sを介したアポトーシスを抑制することが報告されている脳特異的な遺伝子、L F G (L i f e g u a r d) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 22, 12673-12678, (1999)]と相同性を有する、A 4 R S - 0 4 1を見出した。本発明者らは、まずA 4 R S - 0 4 1の塩基配列の解析から、A 4 R S - 0 4 1は、L F Gと約50%の同一性を有するものの、アミノ末端側の約3分の1はほとんど相同性が見られず、全く別の遺伝子であることを見出した。さらに、A 4 R S - 0 4 1が血管内皮細胞をはじめとする種々の組織で広く発現しているのに対し、L F Gは脳で高発現しているが血管内皮細胞での発現が見られず、組織での発現プロファイルが両者で大きく異なることを見出した。さらに、A 4 R S - 0 4 1を安定に高発現する形質転換細胞を作製することで、A 4 R S - 0 4 1がF a sを介したアポトーシスを抑制することを見出し、A 4 R S - 0 4 1がずり応力による血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する鍵となる分子であることを突き止め、本発明を完成させるに至った。

図面の簡単な説明

図1は、ずり応力刺激により発現上昇を示す遺伝子のノーザン解析の結果である。レーン1～41はそれぞれ、A 4 R S - 0 1 6、- 0 2 6、- 0 4 0、- 0 4 1、- 0 6 3、- 0 9 6、- 1 1 6、- 1 2 6、- 1 3 1、- 1 4 8、- 1 5 4、- 1 7 4、- 1 7 5、- 1 9 4、- 1 9 7、- 2 6 0、- 2 7 1、- 3 0 7、- 3 5 5、- 3 8 9、- 3 9 1、- 4 2 3、- 4 3 1、- 4 5 3、- 4 9 2、- 5 0 7、- 5 1 4、- 5 2 3、

－544、－547、－557、－577、－588、－602、－608、－612、－625、－666、－668、－674、－682 についてのずり応力依存的発現上昇を示す。それぞれのプロットにおいて、左側のレーンにはずり応力を負荷していない（刺激時間0時間）H U V E C 由来の全RNAを4 μ g、右側のレーンにはずり応力を負荷したH U V E C 由来の全RNA（刺激時間0.5、1、1.5、2、3、4、6、10、20時間の全RNAを等量ずつ混合したもの）を4 μ g泳動した。

図2は、ずり応力刺激により発現上昇を示す遺伝子のノーザン解析の結果である。レーン42～83はそれぞれ、A4RS－751、－781、－784、－817、－818、－914、－929、－935、－938、－939、－945、－947、－948、－949、－011、－115、－143、－171、－193、－280、－402、－533、－604、－615、－619、－626、－676、－679、－737、－780、－826、－916、－933、－943、－002、－049、－230、－239、－242、－491、－578、－829についてのずり応力依存的発現上昇を示す。それぞれのプロットにおいて、左側のレーンにはずり応力を負荷していない（刺激時間0時間）H U V E C 由来の全RNAを4 μ g、右側のレーンにはずり応力を負荷したH U V E C 由来の全RNA（刺激時間0.5、1、1.5、2、3、4、6、10、20時間の全RNAを等量ずつ混合したもの）を4 μ g泳動した。

図3は、ずり応力刺激により発現する遺伝子の発現の経時的変化を示すノーザンプロットによる解析結果である。レーン1～17はそれぞれA4RS－016、－041、－063、－096、－116、－260、－271、－307、－389、－391、－602、－784、－115、－143、－193、－280、－402についてのずり応力依存的発現上昇を示す。それぞれのプロットにおいて左から、ずり応力負荷時間0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、10、20時間のH

U V E C 由来の全 R N A を $4 \mu\text{g}$ 泳動した。

図 4 は、ずり応力刺激により発現する遺伝子の発現の経時的変化を示すノーザンブロットングによる解析結果である。レーン 18 ~ 28 はそれぞれ A 4 R S - 6 0 4、- 6 2 6、- 9 1 6、- 0 0 2、- 0 4 9、- 2 3 0、- 2 3 9、- 2 4 2、- 4 9 1、- 5 7 8、- 8 2 9 についてのずり応力依存的発現上昇を示す。それぞれのプロットにおいて左から、ずり応力負荷時間 0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、10、20 時間の H U V E C 由来の全 R N A を $4 \mu\text{g}$ 泳動した。

図 5 は、動物細胞発現用プラスミド p A M o - 0 0 2 の構築を示す。

図 6 A および図 6 B は、A 4 R S - 0 4 1 のアポトーシス抑制活性を示した図である。図 6 A は、抗 F a s モノクローナル抗体濃度を 100 ng/ml で固定した場合の経時変化、図 6 B は、刺激時間を 36 時間で固定した場合の、抗 F a s モノクローナル抗体濃度依存性を示している。●は、A 4 R S - 0 4 1、■は G F P を導入した H e L a 細胞を示している。

図 7 A および図 7 B は A 4 R S - 0 4 1 の発現分布を示した図である。図 7 A は、ヒト正常組織における A 4 R S - 0 4 1 の発現をノーザンブロットにより解析した結果を示した図である。図 7 B は、ヒト血管内皮細胞、およびヒト脳における A 4 R S - 0 4 1、L F G の発現を R T - P C R 法により解析した結果を示した図である。

図 8 は、A 4 R S - 0 4 1 と L F G のアミノ酸配列の相同性を示した図である。

発明の詳細な説明

以下に本発明を詳細に説明する。本発明の D N A を調製するに際して用いられる細胞としては、ずり応力の負荷に対して応答性を示すものであれば特に限定されないが、接着系の細胞が好ましく、例えば血管内皮細胞があげられ、特に好ましくはヒト血管内皮細胞が例示される。さら

に好ましくは、ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（H U V E C）があげられる。この血管内皮細胞はヒトさい帯より、細胞、20、329(1988)または Human Cell、1、188(1988)に記載の方法に従って容易に分離できる。また、分離済みの2次培養細胞を入手し、利用することも可能である。血管内皮細胞の継代数は血管内皮細胞としての性質を保持するものであれば良く、好ましくは20継代以内のものがあげられる。

細胞の培養に用いる培養液は、通常の公知の組成に従えばよく、例えば、血管内皮細胞の場合には、ウシなどの動物の血清を0～20%添加した細胞培養用培地を用いることが好ましく、さらに好ましくはE-GM培地（2%ウシ胎児血清含有、倉敷紡績社製）あるいはM199培地にウシ胎児血清を20%添加したものが例示される。細胞の増殖を良くするために培養液中に ECGS(Endothelial cell growth supplement)、EGF(Epidermal growth factor)、あるいは basic FGF(Fibroblast growth factor)等の細胞増殖因子を添加してもよい。培地にデキストラン等を添加し、培養液の粘性を上昇させることにより、培養細胞に高いずり応力を負荷することもできる。

ずり応力を負荷することができる培養装置としては、マイクロキャリア型〔Am. J. Physiol., 259, H804 (1990)〕、回転円盤型〔Biorheology, 25, 461 (1988)〕、平行平板型〔Biotechnol., Bioeng., 27, 1021 (1985)〕等が利用できる。

ずり応力負荷において、血管内皮細胞の培養方法は特に限定されるものではないが、例えば、以下に示す方法が例示される。マイクロキャリアに血管内皮細胞を接着させ、スピナーフラスコ内で培地に懸濁する。培養温度は細胞が培養可能な温度であればいずれの温度でもよいが、37℃が好ましい。培養は、5%の二酸化炭素ガスを満たしたふ卵器内で行なうことが好ましい。取得する細胞数は特に限定されないが、RNA抽出が可能な数であればよく、通常の培養で取得できる程度の数为例示され、好ましくは 1×10^6 個以上である。培養時間は特定されるも

のではないが、ずり応力を負荷していない培養時に比較して明らかに遺伝子発現が変化している培養時間が好ましい。特に細胞の生存状態が良い培養時間が好ましく、具体的には4時間以上24時間以内があげられる。

ずり応力を負荷された血管内皮細胞からの全RNAの調製方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymol., 154, 3(1987)〕等をあげることができる。

全RNAからポリ(A)+RNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング 第2版)等をあげることができる。

更に、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット(Fast Track mRNA Isolation Kit; Invitrogen 社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット(Quick Prep mRNA Purification Kit; Amersham Pharmacia Biotech 社製)等のキットを用いてmRNAを調製することもできる。

以下にcDNAライブラリーの作製方法について述べる。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング(SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; Life Technologies 社製)やザップー cDNA・シンセシス・キット(ZAP-cDNA Synthesis Kit; Stratagene 社製)を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP

Express [Stratagene 社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Res., 17, 9494 (1989)]、 λ zap II (Stratagene 社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ BlueMid (Clontech 社製)、 λ ExCell (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pT7T318U (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNAを組み込んだベクターを導入する大腸菌としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [Stratagene 社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等を用いることができる。

このcDNAライブラリーはずり応力を負荷した血管内皮細胞の特徴を有していることから、生体内血管のずり応力変動部位に起こる病変、具体的には動脈硬化巣の形成等に関与する遺伝子のクローニング、該遺伝子の発現をコントロールすることによる医薬品開発等に有用である。また、このcDNAライブラリーは他の種の細胞、具体的にはずり応力の負荷していない静置培養した血管内皮細胞由来のmRNAを鋳型として作製したcDNAライブラリー等とは、その含有する遺伝子の種類や含有量が異なるため、その差を指標として前述の動脈硬化巣の形成に関与する遺伝子あるいはそれがコードする蛋白質を単離することが可能である。

作製したcDNAライブラリーから、ずり応力負荷により発現が上昇する遺伝子を濃縮する方法として、サブトラクション法 [Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 88, 2825(1991)] やデファレンシャル・ハイブリダイゼーション法 [J. Biol. Chem., 265, 2973(1990)] 等の方法を利用することができる。

上記方法により遺伝子が濃縮されたサブトラクションライブラリーから、発現特異性、即ちずり応力負荷により発現が上昇するクローンを選択する方法として、ノーザンハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング 第2版]、R T (reverse-transcribed) - P C R 法 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー] などがあげられる。

上記の方法で選択された、ずり応力応答性クローンに関して、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは 373A・DNAシーケンサー (Perkin Elmer 社製) 等の塩基配列分離装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

上記方法で決定された塩基配列の新規性は、b l a s t 等の相同性検索プログラムを用いて、G e n B a n k、E M B L および D D B J などの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな同一性を示す塩基配列がないことにより確認できる。

上述の方法で得られたDNAが、ずり応力関連mRNAに対応するcDNAの部分DNAであった場合には、上述の方法で得られたDNAをプローブとして、cDNAライブラリーから完全長cDNAを含むクローンを選択し直すことができる。

cDNAライブラリーからのcDNAクローンの選択としては、アイソトープあるいはジゴキシゲニン (digoxigenin) 標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法 (サンプルックら、モレキュラー・クローニング 第2版(1989年)) により選択することができる。

上記のようにして取得される、新規な塩基配列を有するずり応力応答性遺伝子の完全長 cDNA として、例えば、配列番号 143、145、147、149、151、153、155、157、168、170 および 172 で表される塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

以上のようにして、一旦ずり応力関連遺伝子の完全長 cDNA が取得されその塩基配列が決定された後は、塩基配列に基づいたプライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] により目的とする DNA を取得することができる。また、決定された DNA の塩基配列に基づいて、DNA 合成機で化学合成することにより目的とする DNA を調製することもできる。DNA 合成機としては、フォスフォアミダイト法を利用した Perkin Elmer 社製の DNA 合成機モデル 392 等をあげることができる。

上記 DNA および DNA 断片の塩基配列情報により、常法あるいは DNA 合成機により、本発明の DNA の一部の配列を有するオリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、検出したい mRNA の一部の塩基配列において、5' 末端側の塩基配列に相当するセンスプライマー、3' 末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等をあげることができる。ただし、mRNA においてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミジンとなる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることはないオリゴヌクレオチドで、10～40 塩基数のものが好ましい。

また、本発明においては、該ヌクレオチドの誘導体も用いることができ、例えば、該ヌクレオチドのメチル体やフォスフォチオエート体をあ

げることができる。

以下に、動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質の製造法について述べる。

上述の方法により取得したずり応力応答性遺伝子の cDNA は、動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質をコードしている。

動脈硬化の病変に関与する活性とは、動脈硬化の発症を調節する活性、好ましくは動脈硬化の発症を予防する活性、を意味し、例えば、限定するものではないが、つぎのようなものをあげることができる。

低密度リポ蛋白 (LDL) の血管内皮への取り込みの調節、酸化 LDL の血管内皮への取り込みの調節、血管内皮細胞での LDL 受容体の発現調節、血管内皮細胞での酸化 LDL の産生の調節、血管内皮でのスカベンジャー受容体の発現調節、血管へのリンパ球の浸潤の調節、血管内皮細胞においてリンパ球の血管への浸潤を促進する細胞表面接着分子の発現調節、血管内皮細胞で生産される血管平滑筋の増殖の調節、血管内皮細胞のアポトーシスの調節、等の活性をあげることができる。

本発明の DNA および蛋白質は、血管内皮細胞においてずり応力依存的に発現が上昇するものとして見出されたが、発明の背景の項で記載したとおり、一般に動脈硬化症はずり応力が低く、流れの剥離や停滞または渦などの乱流が起き易い場所で多発することが知られていることから、本発明の DNA および蛋白質は特に、動脈硬化またはそれを原因とする種々の血管病、例えば非限定的な例としての心不全、PTCA 後の再狭窄、高血圧など、を治療または予防するために有用である。

完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、あるいは完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の発現プラスミドを造成する。

該発現プラスミドを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入す

る。

宿主細胞としては、目的とするDNAを発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア(Escherichia)属、セラチア(Serratia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、バチルス(Bacillus)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属等に属する細菌、クルイベロミセス(Kluyveromyces)属、サツカロマイセス(Saccharomyces)属、シゾサツカロマイセス(Shizosaccharomyces)属、トリコスポロン(Trichosporon)属、シワニオミセス(Schawnniomyces)属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込みが可能で、ずり応力応答性DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等を宿主細胞として用いる場合は、ずり応力応答性DNA発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ずり応力応答性DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Amersham Pharmacia Biotech社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10[特開昭58-110600]、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)(Stratagene社製)、pGEX(Amersham Pharmacia Biotech社製)、pET-3(Novagen社製)、pTerm2(USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]等を例示することができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P trp）、lacプロモーター（P lac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター（P trp x 2）、tacプロモーター、letIプロモーター〔Gene, 44, 29 (1986)〕、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャインーダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のずり応力応答性DNAの蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明のずり応力応答性DNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum

ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法〔特開昭 63-248394、または Gene, 17, 107 (1982)や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)〕に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Y E p 1 3 (ATCC37115)、Y E p 2 4 (ATCC37051)、Y C p 5 0 (ATCC37419)、p H S 1 9、p H S 1 5 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター、g a l 1 プロモーター、g a l 1 1 0 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、M F α 1 プロモーター、C U P 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A 1、p c D M 8（フナコシ社製）、p A G E 1 0 7〔特開平 3-22979；Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、p A S 3 - 3（特開平 2-227075）、p C D M 8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、p c D N A I / A m p（Invitrogen 社製）、p R E P 4（I n v i t r o g e n 社製）、p A G E 1 0 3〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、p A G E 2 1 0等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ヒト C M V）の I E（immediate early）遺伝子のプロモーター、S V 4 0の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、S R α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト C M Vの I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ（Namalwa）細胞、サルの細胞である C O S 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である C H O 細胞、H B T 5 6 3 7〔特開昭 63-299〕等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞に D N A を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平 2 - 2 2 7 0 7 5 号公報あるいは特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル（Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual）、カレント・

プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1-38 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

ずり応力応答性DNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にずり応力応答性蛋白質を生成蓄積させ、

該培養物より該蛋白質を採取することにより、ずり応力応答性蛋白質を製造することができる。

本発明のずり応力応答性蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地(Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium[Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の形質転換体の培養物から、本発明の動脈硬化に関連する活性

を有する蛋白質を単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学社製）等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Amersham Pharmacia Biotech 社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 144、146、148、150、152、154、156、158、169、171 および 173 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国 Advanced ChemTech) 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、アロカ(米国 Protein Technology Instrument)社製、クラボウ(米国 Synthecell-Vega)社製、日本パーセプティブ・リミテッド(米国 PerSeptive)社製、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

以下に、本発明の蛋白質を認識する抗体の調製法について述べる。

(i) ポリクローナル抗体の作製

上記の方法により取得した蛋白質の全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物 1 匹当たり 50～100 μ g が好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA 法):医学書院刊 1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory (1988)) 等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはGカラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法が挙げられる。

(i i) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリスー塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、P3-U1と略す）[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用い

ることができる。

これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mmol/l)、2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g/ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g/ml}$) を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g 、リン酸一カリウム 0.21 g 、食塩 7.65 g 、蒸留水 1 リットル、 $\text{pH } 7.2$) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = $5 \sim 10 : 1$ になるよう混合し、 $1,200 \text{ rpm}$ で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、 37°C で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g 、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を $0.2 \sim 1 \text{ ml}$ 添加し、更に $1 \sim 2$ 分間毎に MEM 培地 $1 \sim 2 \text{ ml}$ を数回添加する。添加後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7} \text{ M}$) を加えた培地〕 100 ml 中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに $100 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、 37°C で7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ (Antibodies, A Laboratory

manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている 酵素免疫測定法により、本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法を挙げることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明の蛋白質に特異的に反応するものを本発明の蛋白質モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明の蛋白質の抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（Pristane）0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明の蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。

蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

以下に、本発明の蛋白質を特定のヒト組織内で生産するための組換えウイルスベクターの調製法について述べる。

上述の方法により取得したずり応力応答性遺伝子のcDNAは、動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質をコードしている。

完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、あるいは完全長cDNAをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。

該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞はウイルスのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子のいずれかを欠損している組換えウイルスベクターの該欠損する蛋白質を補給できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来のgag, pol, envなどの蛋白質が、レンチウイルスベクターの場合はHIVウイルス由来のgag, pol, env, vpr, vpu, vif, tat, rev, nefなどの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A・E1Bなどの蛋白質が、アデノ随伴ウイルスの場合はRep(p5, p19, p40), Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

ウイルスベクターとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞でずり応力応答性DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、

p B a b e P u r o [Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596 (1990)], L L - C G、C L - C G、C S - C G、C L G [Journal of Virology, 72, 8150-8157(1998)]、p A d e x 1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821(1995)]、プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ヒトCMV）のI E（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV 40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのI E遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

上記パッケージング細胞への上記組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法〔特開平 2-227075 号公報〕、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

以下に本発明のずり応力応答性DNAを用いて、ずり応力応答性mRNAを検出する方法について述べる。

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170および172で表される塩基配列を有するDNA等があげられる。また、該DNAの一部の配列を有するDNA、該DNAの連続した5～60塩基の塩基配列を有するオリ

ゴヌクレオチドDNA、好ましくは連続した10～40塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドDNAがあげられる。さらにまた、該DNAまたはその断片とストリンジエントな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNAがあげられる。

ヒト生体試料ならびにヒト初代培養細胞での、ずり応力応答性mRNAの発現量の変化ならびに発現しているmRNAの構造の変化を同定することは、将来動脈硬化を発症する危険性や、すでに発症した血管病の原因を知る上で有用である。

ずり応力応答性mRNAの発現量や構造変化を検出する方法としては、例えば（１）ノーザンブロット法（２）in situハイブリダイゼーション法、（３）定量的PCR法、（４）デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、（５）DNAチップ法、（６）RNase保護アッセイ法などの方法等があげられる。

上記方法により分析する材料としては、動脈硬化患者ならびに健常者より取得した血管内皮、血清、唾液等の生体試料、あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる（以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する）。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものを用いることもできる。

ノーザンブロット法とは、該検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、本発明のDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、ずり応力応答性mRNAに特異的に結合したバンドを検出する方法のことであり、ずり応力応答性mRNAの発現量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、プローブと該検体由来RNA中のずり応力応答性mRNAが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。誤った陽性を防ぐため

には、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。これは、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えば、モレキュラー・クローニング 第2版(上記)に記載されている。

ノーザンブロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法(ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキナーゼイング)により放射線同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明のDNAあるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製できる。標識プローブの結合量はずり応力応答性mRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することでずり応力応答性mRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブ結合部位を分析することで、ずり応力応答性mRNAの構造変化を知ることができる。

上記標識プローブおよび、生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いてハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行う in situ ハイブリダイゼーション法によって、ずり応力応答性mRNAの発現量を検出することができる。in situ ハイブリダイゼーション法で、誤った陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。これは、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載されている。

定量的PCR法やデファレンシャル・ハイブリダイゼーション法あるいはDNAチップ等のずり応力応答性mRNAの検出法は、検体由来RNA、オリゴdTプライマーまたはランダムプライマーおよび逆転写酵素を用いてcDNAを合成することに基づいた方法で行うことができる

(以後、該 c D N A を検体由来 c D N A と称する)。検体由来 R N A が m R N A の場合は、上記いずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来 R N A が全 R N A である場合は、オリゴ d T プライマーを用いることが必要である。

定量的 P C R 法では、検体由来 c D N A をテンプレートとし本発明の D N A が有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて P C R を行うことで、ずり応力応答性 m R N A 由来の D N A 断片が増幅される。該増幅 D N A 断片の量はずり応力応答性 m R N A の発現量を反映することから、ずり応力にตอบสนองしないアクチンや G3PDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等をコードする D N A を内部コントロールとして置くことでずり応力応答性 m R N A の量を定量することが可能である。また、該増幅 D N A 断片をゲル電気泳動により分離することで、ずり応力応答性 m R N A の構造の変化を知ることができる。本検出法は、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的 c D N A と特異的に結合して、変性条件で標的からはずれる等の条件に基づき設計することができる。該増幅 D N A 断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加している P C R 回数の内に行うことが必要である。このような P C R 回数は、各回数ごとに生産される該増幅 D N A 断片を回収してゲル電気泳動で分析することで知ることができる。

検体由来 R N A から、標識 d N T P を用いて合成した検体由来 c D N A をプローブとして、本発明の D N A を固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコンなどの基盤に対してハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、ずり応力応答性 m R N A の発現量の変動を検出することができる。このような原理に基づく方法には、デフアレシヤル・ハイブリダイゼーション法 [Trends in Genetics, 7, 314-317(1991)] や D N A チ ッ プ 法 [Genome

Research, 6, 639-645(1996)) と呼ばれる方法がある。いずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG 3 P D Hなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体の間でのずり応力応答性m R N Aの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と検体由来のR N Aをそれぞれ異なる標識d N T Pを用いてc D N A合成を行い、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に二つの標識c D N Aプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確なずり応力応答性m R N Aの発現量の定量を行うことができる。

R N a s e 保護アッセイでは、まず本発明のD N Aの3' 端にT 7 プロモーター、S P 6 プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、R N Aポリメラーゼを用いた in vitro の転写系により標識したr N T Pを用いて、標識したアンチセンスR N Aを合成する。該標識アンチセンスR N Aは、検体由来R N Aと結合させて、R N A-R N Aハイブリッドを形成させた後、R N a s eで消化し、消化から保護されたバンドをゲル電気泳動で検出する。保護されたバンドを定量することで、ずり応力応答性m R N Aの発現量を定量することができる。

以下に本発明のずり応力応答性D N Aを用いて動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法について述べる。

当該方法に用いられるD N Aとしては、例えば配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170および172で表される塩基

配列を有するDNA等があげられる。また、該DNAの一部の配列を有するDNA、該DNAの連続した5～60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドDNA、好ましくは連続した10～40塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドDNAがあげられる。さらにまた、該DNAまたはその断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNAがあげられる。

ずり応力応答性遺伝子座中に存在する動脈硬化の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からの遺伝子と動脈硬化患者からの遺伝子とを直接比較することである。

具体的には10～100人の動脈硬化患者ならび健常者から、血管内皮、血清、唾液等のヒト生体試料あるいは、該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料ならびに該初代培養細胞由来試料中からDNAを抽出する（以後、該DNAを検体由来DNAと称する）。該検体由来DNAは直接あるいは、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてずり応力応答性DNAを増幅して用いることができる。別法として、該検体由来cDNAをテンプレートとして、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーによりPCRを行うことでずり応力応答性DNA配列を含むDNA断片を増幅して用いることができる。

本発明のDNAに動脈硬化の原因となる変異があるかどうかを選別する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。

ヘテロ二本鎖を検出する方法には、（1）ポリアクリルアミド電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法〔Trends Genet., 7, 5(1991)〕、（2）一本鎖コンフォメーション多型解析法〔Genomics, 16, 325-332(1993)〕、（3）ミスマッチの化学的切断法（CCM, chemical cleavage of mismatches）、（4）ミスマッチの酵素的切断法〔Nature Genetics, 9, 103-104(1996)〕、

(5) 変性ゲル電気泳動法 [Mutat. Res., 288, 103-112(1993)] 等の方法があげられる。

検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、ずり応力応答性DNAを本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さい断片として増幅し、ポリアクリルアミド電気泳動を行うことにより、ずり応力応答性DNAの変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、それらは余分なバンドとして検出することができる。特製のゲル (Hydro-link, MDE など) を用いたほうが分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション解析と組み合わせた1枚のゲルで行うことが望ましい。

一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP解析; single strand conformation polymorphism analysis) では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さい断片として増幅したずり応力応答性DNAを変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で泳動する。DNA増幅を行う際にプライマーを同位体あるいは蛍光色素で標識するか、または未標識の増幅産物を銀染色することにより、増幅したずり応力応答性DNAをバンドとして検出することができる。野生型のパターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同時に泳動すると、変異を持った断片を移動度の違いから検出できる。

ミスマッチ化学的切断法 (CCM法) では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、ずり応力応答性DNAを本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を、本発明のDNAに同位体あるいは蛍光標識をとり込ませた標識DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ変異を検出することがで

きる。CCMは最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

上記、四酸化オスミウムの代わりにT4ファージリゾルベースとエンドヌクレアーゼVIIのような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵素とRNaseAと組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断することもできる。

変性ゲル電気泳動法（denaturing gradient gel electrophoresis：DGGE法）では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、ずり応力応答性DNAを本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅したDNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。ずり応力応答性DNAに変異がある場合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ（G：C）末端を付けるとよい。

本発明のDNAに動脈硬化の原因となる変異があるかどうかを選別する別の方法として、蛋白質短縮試験（protein truncation test：PTT法）〔Genomics, 20, 1-4(1994)〕がある。該試験により蛋白質の欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。PTT法では、本発明のDNAの5'末端にT7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来RNAより逆転写PCR（RT-PCR）法でcDNAを作製する。該cDNAを用い、in vitro転写、翻訳系で反応させると、T7プロモーターによりmRNAに転写され、翻訳開始配列により翻訳され、蛋白質が生産される。該蛋白質をゲルに泳動して、該蛋白質の泳動位置が完全長蛋白質に相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該蛋白質

に欠損がある場合は、完全長蛋白質より短い位置に該蛋白質は泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

検体由来DNAならびに検体由来cDNAの塩基配列を決定するために本発明のDNAが有する塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いることが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAに動脈硬化の原因となる変異があるか否かを判別できる。

ずり応力応答性遺伝子のコード領域以外の突然変異は、該遺伝子の付近またはその中のイントロンおよび調節配列のような、非コード領域を検査することによって検出し得る。非コード領域中の突然変異に起因する動脈硬化疾患は、上記に記載した方法に従い対照検体と比較した場合の、動脈硬化患者における異常なサイズの、または異常な生産量のmRNAを検出することで確認することができる。

このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該遺伝子については、本発明のDNAをハイブリダイゼーションのプロープとして用いることにより、非コード領域のDNAをクローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

見い出された突然変異は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore(1994)に記載された方法に従い統計処理を行うことで、動脈硬化との連鎖があるSNPs(シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同定することができる。また、動脈硬化の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従いDNAを取得し、変異を検出することで、動脈硬化の原因遺伝子を同定することができる。

以下に本発明のずり応力応答性DNAを用い動脈硬化を原因とする血管病を診断する方法について述べる。

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号1, 3, 5,

7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170および172で表される塩基配列を有するDNA等があげられる。また、該DNAの一部の配列を有するDNA、該DNAの連続した5～60塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドDNA、好ましくは連続した10～40塩基の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドDNAがあげられる。さらにまた、該DNAまたはその断片とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNAがあげられる。

動脈硬化の原因は、ヒトのいずれかの組織における遺伝子の突然変異を検出することによって確認し得る。例えば、生殖細胞系に突然変異がある場合、当該変異を遺伝した個人は、動脈硬化を発症し易い傾向である可能性がある。当該突然変異は、該個人の体のいずれかの組織からのDNAを試験することによって決定し得る。例えば、採血しその血液の細胞からDNAを抽出し、このDNAを用い、遺伝子の突然変異を試験することにより、動脈硬化を診断することができる。また、胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を用い、遺伝子の突然変異を試験することにより、出生前診断を行うことができる。

また血管病を発症した患者から、病巣部位の生体組織を取得してDNAを試験することにより、血管病の種類を診断し、投与する薬物の選択などに利用することができる。組織中の遺伝子の変化を検出するためには、周囲の正常組織から遊離した病巣部位の組織を単離することが有用

である。動脈硬化巣は、動脈硬化の発症部位を健常な血管と取替えるバイパス手術等により取得することができる。このようにして取得した組織をトリプシンなどで処理し、得られた細胞を適当な培地で培養する。培養した細胞からは染色体DNAならびにmRNAを抽出することができる。

以後、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したDNAを診断検体由来DNAと称する。また、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したRNAより合成したcDNAを診断検体由来cDNAと称する。

本発明のずり応力応答性DNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを用い、上記動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法に準じた方法により、動脈硬化の診断を行うことができる。

また、本発明のずり応力DNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを利用した動脈硬化の診断には（１）制限酵素部位の検出、（２）対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブの利用（ASO: allele specific oligonucleotide hybridization）、（３）対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCR（ARMS: amplification refractory mutation system）、（４）オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（OLA: oligonucleotide ligation assay）、（５）PCR-PHFA法（PCR-preferential homoduplex formation assay）、（６）オリゴDNAアレイ〔蛋白質核酸酵素、43, 2004-2011（1998）〕等の方法も用いることができる。

単一塩基変化により制限酵素部位が消失あるいは発生する場合は、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを、本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーで増幅し、該制限酵素で消化し、得られた制限酵素切断DNA断片を正常人の場合と比較することで簡便に変異を検出することができる。しかしこのような変化が起こることはまれであり、診断目的には、本発明のDNAが有する配列に基づき設計

したPCRプライマーにアニーリングに影響を与えないミスマッチを導入することで、制限酵素部位の消失や発生を伴わない変異に対して、人工的に制限酵素部位を導入することが行われる。

短い合成DNAプローブは、完全に対合する配列とだけハイブリダイズする。この特徴を利用して、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブ（ASO）を作製することで、1塩基の変異を容易に検出することができる。診断目的には、本発明のDNAが有する配列と同定された変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドをフィルターに結合させ、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAから本発明のDNAが有する配列を用いて設計したプライマーと標識したdNTPを用いたPCRで作製したプローブを用いてハイブリダイズを行うリバースドットプロットが用いられることが多い。スライドガラスやシリコンなどの基盤に直接、本発明のDNAが有する配列と該変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドを合成して、高密度のアレイをつくったDNAチップ法は、少量の診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを利用して多様な変異をより簡便に検出できるため大規模な診断目的に適した変異検出法である。

塩基変異は、以下のオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（OLA）法によっても検出できる。

突然変異部位を挟んで両側にハイブリダイズする本発明のDNAが有する配列より設計した20塩基程度のオリゴヌクレオチドを2本作製する。診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレートとして用い、本発明のDNAが有する配列から設計したプライマーを用い、PCRによりずり応力応答性DNA断片を増幅する。該増幅断片と上記ポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後に、DNAリガーゼで2本のオリゴヌクレオチドを連結させる。例えば、一方のオリゴヌクレオチドにはビオチンを、他方のオリゴヌクレオチドにジゴケシゲニンのような異なる標識をつけると、連結反応が起こったか

どうかを速やかに検出することが可能である。OLAは電気泳動や遠心分離操作が不要なために、大規模な診断目的として適した変異検出法である。

また、以下のPCR-PHFA法により微量な変異遺伝子を定量的かつ容易に検出することができる。

PCR-PHFA法は、遺伝子増幅法（PCR）、非常に高い特異性を示す液相でのハイブリダイゼーション、ELISAと同様の操作でPCR産物を検出するED-PCR (enzymatic detection of PCR product) の3つを組み合わせたものである。dinitrophenyl (DNP) 標識およびビオチン標識したプライマーセットを用いて、本発明のDNAをテンプレートにPCR増幅を行い、両末端標識増幅物を調製する。これに対して、標識を持たない同じ配列を有するプライマーセットと診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレートに増幅して得た非標識増幅物を20～100倍の大過剰量混合する。そして熱変性後、1℃/5分～10分程度の緩やかな温度勾配で冷却し、完全な相補鎖を優先的に形成させる。こうして再形成された標識DNAはビオチンを介してストレプトアビジン固定化ウエルに捕獲吸着し、他方のDNPを介して酵素標識抗DNP抗体を結合させて酵素による発色反応により検出する。検体中に標識DNAと同じ配列の遺伝子が存在しない場合は、元の2本鎖の標識DNAが優先的に再形成されて発色を示す。これに対し、同じ配列の遺伝子が存在する場合は、相補鎖の置換がランダムに生じるため再形成される標識DNAは減少するので、発色は著しく低下する。これにより、既知の変異・多型遺伝子の検出・定量が可能となる。

以下に、本発明の抗体を用いて、本発明のずり応力応答性蛋白質を免疫学的に検出および定量する方法について述べる。

本発明の抗体（ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体）を用いて、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織を、

免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（E L I S A法）、放射性物質標識免疫抗体法（R I A）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（A B C法、C S A法等）、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチE L I S A法〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック）（1987）、続生化学実験講座5免疫生化学研究法（東京化学同人）（1986）〕などがあげられる。

蛍光抗体法とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（F I T C）などの蛍光物質でラベルした抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

酵素免疫測定法（E L I S A法）とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞に、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗マウスI g G抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（R I A）とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスI g G抗体あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察す

る方法である。

ウェスタンブロッティング法とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルをPVDF膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、確認する方法である。

ドットブロッティング法とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

免疫沈降法とは、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を本発明の抗体と反応させた後、プロテインG-セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

サンドイッチELISA法とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる2種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体をプレートに吸着させ、もう一方の抗体をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、本発明の蛋白質を細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

以下に本発明の抗体を用いて動脈硬化を原因とする血管病を診断する方法について述べる。

ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、ずり応力応答性蛋白質の発現量の変化ならびに発現している蛋白質の構造変化を同定することは、将来動脈硬化を発症する危険性やすでに発症した血管病の原因を知る上で有用である。

ずり応力応答性蛋白質の発現量や構造変化を検出して診断する方法としては、上記した、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（E L I S A法）、放射性物質標識免疫抗体法（R I A）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（A B C法、C S A法等）、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチE L I S A法などがあげられる。

上記方法により診断する材料としては、ヒト検体より取得した病巣部位の血管、血液、血清、尿、便、唾液などの生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

以下に本発明のずり応力応答性D N A、該D N Aがコードする蛋白質または該蛋白質を認識する抗体を用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法について述べる。

当該スクリーニング方法において用いられるD N Aとしては、例えば配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 130, 131, 132, 13

3, 134, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170および172で表される塩基配列を有するDNA、または、該DNAもしくはその断片とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNAがあげられ、蛋白質としては、該DNAによってコードされる蛋白質(例えば配列番号144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 169, 171および173で表されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質など)、あるいは、該蛋白質の有するアミノ酸とは1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸からなり、かつ動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質があげられ、抗体としては、該蛋白質を認識する抗体があげられる。

本発明のDNAを導入して本発明の蛋白質あるいは該蛋白質の一部を構成するポリペプチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞ならびに、精製した該蛋白質あるいは該ポリペプチドは、ずり応力応答性蛋白質に特異的に作用する薬剤をスクリーニングするために有用である。スクリーニングにより得られた薬剤は、動脈硬化を原因とする血管病の治療に有用である。

上記スクリーニングの1つの方法は、本発明の蛋白質あるいは該蛋白質の一部を構成するポリペプチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞(以後探索用形質転換体と称する)に特異的に結合する標識化合物を選択することである。形質転換していない微生物、動物細胞、または昆虫細胞を対照群として比較することで、特異的な標識化合物の結合を検出することができる。また、該探索用形質転換体に特異的に結合する化合物あるいは蛋白質の該探索用形質転換体に対する結合を阻害することを指標に、非標識化合物を競合スクリーニングすることができる。

精製した本発明の蛋白質または該蛋白質の一部を構成するポリペプチ

ドは、ずり応力応答性蛋白質に特異的に結合する標識化合物を選択するのに用いることができる。標識化合物の結合を定量するには、本発明の抗体を用いて上記の免疫学的方法により行うことができる。また、該蛋白質あるいは該ポリペプチドに結合する標識化合物の該蛋白質あるいは該ポリペプチドに対する結合を阻害することを指標に、非標識化合物を競合スクリーニングすることができる。

上記スクリーニングのもう 1 つの方法としては、該蛋白質の一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物あるいは蛋白質を効率的にスクリーニングする方法がある（WO 84/03564）。

血管内皮細胞で、ずり応力応答性 mRNA あるいは蛋白質の発現を調節する発現調節用薬剤も、動脈硬化を原因とする血管病の治療に有効である。

血管内皮細胞系統に種々の化合物を添加し、本発明の DNA を用いて、ずり応力応答性 mRNA の発現の増減を検定することでずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングすることができる。ずり応力応答性 mRNA の発現の増減は、上記した PCR 法、ノーザンブロット法、RNase 保護法により検出できる。

血管内皮細胞系統に種々の化合物を添加し、本発明の抗体を用いて、ずり応力応答性蛋白質の発現の増減を検定することでずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングすることができる。ずり応力応答性蛋白質の発現の増減は、上記した蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA 法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC 法、CASA 法等）、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチ ELISA 法により検出できる。

上述の方法により取得した化合物は、ApoE ノックアウトマウスや高コレステロール食を与えたウサギなどの動脈硬化モデル動物に薬剤と

して投与し、該動物の酸化LDLやコレステロールの血管内皮への取り込みならびに動脈硬化病変の形成を測定することにより、該化合物のその動脈硬化を原因とする血管病への治療効果を評価することが可能である。

以下に本発明の抗体を用いたドラッグデリバリーの方法について述べる。

当該ドラッグデリバリーに用いられる抗体は、本発明の抗体であればいずれでも良いが、特にヒト化抗体を用いることが望ましい。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR(Complementary Determining Region;相補性決定領域;以下、CDRと記す)移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域(以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す)および抗体軽鎖可変領域(以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す)とヒト抗体の重鎖定常領域(以下、定常領域はC領域としてCHとも称す)およびヒト抗体の軽鎖定常領域(以下、CLとも称す)とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、本発明の蛋白質に結合し、本発明の蛋白質の作用を中和するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、hIgと表記する)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのものが好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIg

G 2、h I g G 3、h I g G 4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の C L としては、h I g に属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

ヒト型 C D R 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R のアミノ酸配列をヒト抗体の V H および V L の適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明の ヒト型 C D R 移植抗体は、本発明の蛋白質に反応し、本発明の蛋白質に結合し、本発明の蛋白質の作用を中和する、ヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R 配列で任意のヒト抗体の V H および V L の C D R 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする c D N A を構築し、ヒト抗体の C H およびヒト抗体の C L をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 C D R 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

ヒト型 C D R 移植抗体の C H としては、h I g に属すればいかなるものでもよいが、h I g G クラスのものが好適であり、更に h I g G クラスに属する h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 C D R 移植抗体の C L としては、h I g に属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒトの体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒトの体内に存在する抗体は、例えば、以下の方法により取得することができる。

ヒト末梢血リンパ球を単離し、E B ウイルス等を感染させ不死化さ

せた後、クローニングする。得られた該抗体を産生するリンパ球を培養し、培養物中より該抗体を取得することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりF a b、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、完全型ヒト抗体へ変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスE S細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該E S細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法としては、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させる方法があげられる。

抗体断片としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体、d s F v、C D Rを含むペプチドなどがあげられる。

F a b は、I g Gを蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のF a b は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。また、該抗体のF a b をコードするD N Aを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該D N Aを発現させることによりF a b を取得することができる。

$F(a b')_2$ は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の $F(a b')_2$ は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。また、該抗体の $F(a b')_2$ をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該DNAを発現させることにより、 $F(a b')_2$ を取得することができる。

Fab' は、上記 $F(a b')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab' は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。また、該抗体の Fab' 断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該DNAを発現させることにより、Fab' を取得することができる。

一本鎖抗体（以下、scFvとも称す）は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドを示す。本発明で使用される scFv に含まれる VH および VL は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明の一本鎖抗体は、以下の方法により取得できる。

本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得後、一本鎖抗体をコードする DNA を構築する。該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿

入後、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該DNAを発現させることにより、一本鎖抗体を取得することができる。

ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法〔Protein Engineering, 7, 697 (1994)〕に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で用いられるジスルフィド安定化V領域断片に含まれるVHおよびVLは本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のジスルフィド安定化V領域断片は、以下の方法により取得することができる。

本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得後、ジスルフィド安定化V領域断片をコードするDNAを構築する。該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該DNAを発現させることにより、ジスルフィド安定化V領域断片を取得することができる。

CDRを含むペプチドは、Fmoc法、tBoc法等の化学合成法によって製造することができる。

本発明の抗体により調製された以下に述べる融合抗体は、動脈硬化の病巣へ特異的に薬剤や蛋白質を運ぶ、ドラッグデリバリーに用いることができる。

融合抗体は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体をいう。

本発明の融合抗体は、本発明の蛋白質に特異的に反応する抗体および抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体および抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体および抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させることにより製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミンT法等により、抗体または抗体断片に結合させることができる。低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤〔臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社）〕、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社）などがあげられる。

定法により上記抗体に低分子の薬剤を結合させることができるが、例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインや血管内皮、血管平滑筋等の増殖制御因子が好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子、ヒトマクロ

ファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン 1 2、繊維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)、血小板由来増殖因子 (PDGF) 等があげられる。また、動脈硬化巣の増殖性血管平滑筋細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。

蛋白質との融合抗体は、以下の方法により取得できる。

抗体または抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させた後、融合抗体をコードする DNA を構築する。該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入後、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入し、該 DNA を発現させることにより、融合抗体を取得することができる。

次に本発明のずり応力応答性 DNA を含有するウイルスベクターを用いた遺伝治療の方法について述べる。

上述した組換えウイルスベクターおよび遺伝子治療剤に用いる基剤を調査することにより治療剤を製造することができる [Nature Genet., 8, 42(1994)]。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、遺伝子治療の直前に液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して治療に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、患者の治療部位の血管内皮に吸収

されるように、ダブルバルーンカテーテル等を用いて局所的に投与する方法をあげることができる。

より特異的に動脈硬化巣にウイルスベクターを輸送する方法として、LDL受容体を特異的に認識する一本鎖抗体とレトロウイルスベクターのEnv蛋白の融合蛋白を用いる方法がSomiaらにより報告されている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7570-7574 (1995)〕。本システムはレトロウイルスベクターに限定されず、レンチウイルスベクター等にも応用することができる。

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法〔Virology, 52, 456-467 (1973); Science, 209, 1414-1422 (1980)〕、マイクロインジェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980); Cell, 27, 223-231 (1981); Nature, 294, 92-94 (1981)〕、リポソームを介した膜融合-介在移入法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267-275, (1992); Science, 249, 1285-1288 (1990); Circulation, 83, 2007-2011 (1992)〕あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移入法〔Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989); BioTechniques, 11, 474-485 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)〕等をあげることができる。

ウイルスベクターを用いる遺伝子移入は、リポソームデリバリーを用

いる直接的イン・ビボ(in vivo)遺伝子移入と組み合わせることにより、動脈硬化巣にウイルスベクターを指向させることができる。

その他適当なサイズの本発明のDNAを、アデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

リポソームを介した膜融合-介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている〔Hum. Gene Ther., 3, 399-410 (1992)〕。したがって同様の効果が動脈硬化巣でも期待される。DNAを、動脈硬化巣に直接標的化するには、遺伝子移入技術が好ましい。受容体-媒介DNA移入は、例えば、ポリリジンを介して、蛋白質リガンドにDNA(通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる)をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。受容体とリガンドの組み合わせとしては、例えばLDL受容体とLDL、スカベンジャー受容体と酸化LDLの組み合わせが包含される。当該リガンド-DNAコンジュゲートは、所望により、血液に直接注射することができ、受容体結合およびDNA-蛋白質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

以下に、本発明のずり応力応答性DNAを特異的に認識する抗体を用いた治療方法について説明する。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも

可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、本発明の抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は本発明の抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明の抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。本発明の抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ である。

動脈硬化の病変に関与する活性、即ち動脈硬化の発症を調節する活性の一つとして、血管内皮細胞のアポトーシスの促進あるいは抑制があげられる。血管内皮細胞においては、ずり応力負荷により、内皮細胞のアポトーシスが抑制される方向に傾くことが知られていることから、本発明のずり応力応答性DNAの中には、血管内皮細胞においてずり応力刺激依存的に発現が上昇し、アポトーシス抑制活性を有する遺伝子および蛋白質が含まれているものと考えられる。従って、このアポトーシス抑制活性を有する遺伝子を含むDNAおよび該DNAがコードする蛋白質、該DNAをベクターに組み込んでなる組換えウィルスベクター、該DNAがコードする蛋白質に対する抗体などを用いることにより、(1)細胞のアポトーシス感受性の同定(2)細胞のアポトーシスの調節、(3)細胞のアポトーシスを調節する薬剤のスクリーニングなどの応用が可能となる。以下に、前記(1)(2)(3)について詳細に述べる。

(1) 細胞のアポトーシス感受性の同定

以下に本発明のずり応力応答性DNA、該DNAがコードする蛋白質を用いて、細胞のアポトーシス感受性を同定する方法について述べる。

アポトーシス感受性とは、外来からのアポトーシス刺激に対して、細胞がアポトーシスに陥りやすいか否かの程度、即ち細胞のアポトーシス

刺激に対する影響度を意味しており、このアポトーシス感受性は、細胞におけるアポトーシスシグナルに対して抑制性もしくは促進性のシグナルが共存しているか否かによって規定されてくるものと考えられ、この分子の実体としては、アポトーシスシグナル伝達分子などアポトーシスの抑制若しくは促進に関与する一群の蛋白質、いわゆるアポトーシス関連蛋白質があげられる。このアポトーシス関連蛋白質として、例えば、本発明の配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA (A4RS-041) にコードされる蛋白質、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

血管内皮細胞に負荷される血行力学的物理力として、一定の方向性を持った血流、即ち層流に起因し血流方向と平行に負荷されるずり応力と、血圧に起因し内皮に対して垂直方向に負荷される法線応力があげられる。血管内皮細胞は常にこの両方の力を受けているが、一般にずり応力が法線応力と比較して大きな部位では動脈硬化の発症が抑制され、逆にずり応力にくらべて法線応力の大きな部位では動脈硬化が発症しやすい。実際、血管内皮細胞に対してアポトーシスを抑制するのは、層流に起因するずり応力であることが報告されている。本発明の DNA を取得するために用いた培養系、即ちマイクロキャリア／スピナーフラスコ系においては、流れによるずり応力だけでなく、回転により遠心力が負荷されるため、法線応力もまた内皮細胞に負荷される。ずり応力に応答する遺伝子群は法線応力により修飾されるものと修飾されないものがある。このような反応性の違いは、ずり応力のみが負荷される平行平板型培養装置等で培養した HUVEC において発現上昇の有無を確認することで明確にできる。少なくとも法線応力により修飾されないずり応力応答性遺伝子群は動脈硬化に対して保護的に働くと考えられ、これら遺伝子群のなかにアポトーシス抑制活性を有する遺伝子および蛋白質が含まれていると考えられる。

そのアポトーシス抑制活性を有する本発明の DNA または該 DNA の

塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたはアポトーシス抑制活性を有する本発明の蛋白質を認識する抗体などを用いて、アポトーシス抑制活性を有する本発明のDNAの内在性の転写量若しくは、アポトーシス抑制活性を有する本発明の蛋白質の発現量、発現している蛋白質の構造変化を検出することにより細胞のアポトーシス感受性を同定することができる。

アポトーシス感受性を同定する方法において用いられるDNAおよび該DNAがコードする蛋白質を認識する抗体として、例えば配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体があげられる。

上記方法で用いられた本発明のDNAまたは該DNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたはアポトーシス抑制活性を有する本発明の蛋白質を認識する抗体は細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤として有効である。

動脈硬化巣では、血管内皮細胞のアポトーシスが促進されていることから、本薬剤は、動脈硬化巣の同定あるいは将来動脈硬化を発症する危険性の予測など動脈硬化を原因とする血管病変の診断薬としても利用できる。

細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤として、例えば、配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、または、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体などを含有する薬剤があげられる。

尚、本発明のDNAは、ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いて、ずり応力応答性DNAとして取得されてきたものであるから、アポトーシス感受性を同定する対象の細胞としては、ヒト初代血管内皮細胞およびヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）などの血管内皮

細胞であることが望ましいが、アポトーシスは血管内皮細胞以外の生体のあらゆる細胞で普遍的にみられる現象であることから、対象となる細胞は、血管内皮細胞のみに限定されるものではない。

(2) 細胞のアポトーシスの調節

本発明のDNAは、ずり応力により発現が上昇しアポトーシスを抑制する方向に誘導することが知られているずり応力刺激に応答する遺伝子であることから、本発明のDNAまたは該DNA中の連続した5から60塩基の配列を有するDNAは、アポトーシスの抑制に関与する。一方、これらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを用いる場合には、該DNAの内在性の転写もしくは翻訳が抑制されるために細胞のアポトーシスが促進される。

また、本発明のDNA同様に、本発明のDNAがコードする蛋白質または該蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞のアポトーシスを調節することもできる。具体的には、本発明のDNAがコードする蛋白質のうち、アポトーシスを抑制する活性を有する蛋白質を選別し、該蛋白質をコードするDNAをウィルスベクターに組み込んで得られる組換えウィルスベクターを造成し、その組換えウィルスベクターを細胞や組織に導入して、アポトーシスを抑制する活性を有する蛋白質を発現させることにより、細胞や組織のアポトーシスを抑制することができる。

また該蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞にアポトーシスを調節する正負のシグナルを付与することにより細胞のアポトーシスを調節することができる。

アポトーシスを抑制または促進する方法として、例えば、配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、またはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを用いて、例えばアンチセンス法等により該DNAの内在性の転写もしくは翻訳を抑制することにより細胞のアポトーシスを促進したり、逆

に該DNAを細胞に導入してDNAの転写を亢進させることにより細胞のアポトーシスを抑制する方法があげられる。

また、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えウイルスベクター、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクターまたは配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターを用いて、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の細胞内の発現量を亢進させ、細胞のアポトーシスを抑制する方法があげられる。

さらには、配列番号8で表されるアミノ酸配列はその構造から膜蛋白質と考えられることから、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を作用させ、細胞表面に表出した該蛋白質を刺激することにより、細胞内に細胞のアポトーシスを正負に調節するシグナルを流れさせ、細胞のアポトーシスを調節する方法があげられる。

上記方法に用いられた本発明のDNAまたは該DNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、アポトーシス抑制活性を有する本発明の蛋白質を発現する組換えウイルスベクターまたは本発明の蛋白質を認識する抗体などは細胞のアポトーシスを調節する薬剤として有効である。本薬剤は、動脈硬化を原因とする血管病変の治療薬としても利用できる。

アポトーシスを調節する薬剤として、例えば、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えウイルスベクター、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターまたは、

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する薬剤があげられる。

尚、本発明の DNA は、ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（H U V E C）を用いて、ずり応力応答性 DNA として取得されてきたものであるから、アポトーシスを調節する対象の細胞としては、ヒト初代血管内皮細胞およびヒトさい帯静脈血管内皮細胞（H U V E C）などの血管内皮細胞であることが望ましいが、アポトーシスは血管内皮細胞以外の生体のあらゆる細胞で普遍的にみられる現象であることから、対象となる細胞は、血管内皮細胞のみに限定されるものではない。

（３）細胞のアポトーシスを調節する薬剤のスクリーニング

以下に本発明のずり応力応答性 DNA、該 DNA がコードする蛋白質を用いて、細胞のアポトーシスを調節する薬剤をスクリーニングする方法について述べる。

上記スクリーニングの方法の 1 つは、F a s 依存的にアポトーシスが惹起される動物細胞株を用いてアポトーシスを誘導した際に、本発明の DNA の内在性の転写もしくは翻訳を調節することによりアポトーシスを抑制または促進する化合物あるいは蛋白質を選択することである。

特に、本発明の DNA の内在性の転写もしくは翻訳を促進することによりアポトーシスを抑制する化合物あるいは蛋白質は、動脈硬化を原因とする血管病の治療に有効である。一方、本発明の DNA の内在性の転写もしくは翻訳を抑制することによりアポトーシスを促進する化合物あるいは蛋白質は、癌などの細胞の異常増殖に基く疾患の治療に有効である。

本発明の DNA を用いて細胞のアポトーシスを調節する薬剤をスクリーニングする方法として、例えば、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA または配列番号 7 で表される塩基配列中の連続した 5 ～ 6 0 塩基と同じ配列を有する DNA を用いて、被験物質を細胞に作用させた後の配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の内在性の転写量の

増減を検定することにより細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法があげられる。

上記スクリーニングのもう 1 つの方法は、本発明の DNA を導入して本発明の蛋白質あるいは蛋白質の一部を構成するポリペプチドを生産するように形質転換した動物細胞に特異的に結合して細胞のアポトーシスを抑制する化合物あるいは蛋白質を選択することである。この際、形質転換していない細胞を対照として比較することで、特異的な化合物あるいは蛋白質の結合を検出することができる。このスクリーニングにより得られた薬剤も、動脈硬化を原因とする血管病の治療に有効である。

本発明の蛋白質を用いたスクリーニング方法として、例えば、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA を含む組換えウイルスベクターまたは配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA のセンス鎖と相同な配列からなる RNA を含む組換えウイルスベクターを用いて、細胞内に配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA を導入し、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を発現させ、該細胞に被験物質を暴露し、被験物質と該蛋白質とを接触させ、該蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質の活性変化をもたらす薬剤を選択することにより、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法があげられる。

また、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA、または配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を、宿主細胞に導入して得られる形質転換体を培地に培養し、該培養物を用いて、培養物中の該蛋白質と被験物質とを接触させ、該蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質の活性変化をもたらす薬剤を選択することにより、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法があげられる。

また、in vitro の系で、単離精製した配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質若しくは配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有す

る蛋白質の一部を構成するペプチドを用いて、被験物質と該蛋白質または該ペプチドとを接触させ、該蛋白質・ペプチドに特異的に結合し、該蛋白質の活性変化をもたらす薬剤を選択することにより、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法があげられる。

細胞内の配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの転写量の増減を指標にアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする際には、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAをプローブ若しくはプライマーとして用いて、ノーザンハイブリダイゼーション法、in situ ハイブリダイゼーション法、RNase保護法あるいはRT-PCR法などにより該DNAの転写量を解析することができる。

また、細胞内の配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の発現量を指標にアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする際には、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いた免疫学的検出法により該蛋白質の発現量を解析することができる。

上記スクリーニングにより取得された薬剤は、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤として利用できる。

尚、本発明のDNAは、ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いて、ずり応力応答性DNAとして取得されてきたものであるから、アポトーシスを調節する対象の細胞としては、ヒト初代血管内皮細胞およびヒトさい帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）などの血管内皮細胞であることが望ましいが、アポトーシスは血管内皮細胞以外の生体のあらゆる細胞で普遍的にみられる現象であることから、対象となる細胞は、血管内皮細胞のみに限定されるものではない。

本発明のDNAを動物細胞中で発現させるためのベクター、および組

換えベクターの導入方法としては、既に述べた方法のいずれも用いることができる。

本発明の蛋白質の発現量の増減を抗体を用いて検定する免疫学的検出法については、すでに述べた方法のいずれも用いることができる。

アポトーシスの抑制または促進を検出するためのスクリーニング系に必要な宿主細胞としては、F a s 依存的にアポトーシスが誘導される動物細胞であればいずれも用いることができ、例えば浮遊系の J u r k a t [J. Exp. Med., 152, 1709-19 (1980)]、H P B - A L L [Int. J. Cancer, 21, 166-170 (1978)]、S K W 6 . 4 [Immunol. Lett., 7, 17-23 (1983)]、接着系の H e L a、A 6 7 3 [Arch. Biochem. Biophys., 230, 93-102 (1984)] 等があげられる。

上記細胞株に F a s 依存的な細胞死を誘導する物質として、例えば、抗ヒト F a s モノクローナル抗体 C H - 1 1 [J. Exp. Med., 169, 1747-1756 (1989)] があげられる。細胞死を誘導する方法として例えば、以下のような方法があげられる。浮遊細胞の場合、約 10^6 細胞 / m l になるように培地で希釈して動物細胞培養用の 24 穴プレート、あるいは 96 穴マイクロタイタープレート等に加える。ここに、抗ヒト F a s モノクローナル抗体を $1 \sim 500$ n g / m l の濃度になるように添加し、 37°C の CO_2 インキュベータ中で数時間から 2 日間、培養する。附着細胞の場合、あらかじめ細胞をプレートにまいておき、細胞死を誘導する際に、抗ヒト F a s モノクローナル抗体を含む培地に交換して 37°C の CO_2 インキュベータ中で培養を継続する。

アポトーシスの抑制または促進を検出するための方法として例えば、トリパンブルー染色法、ギムザ染色法等を用いて光学顕微鏡観察により検出する方法があげられる。また、接着細胞であればアポトーシスとともにプレートから細胞が剥がれて浮遊してくるため、染色することなく、より容易に判別できる。また、ヘキスト 33342、ヘキスト 33258、ヨウ化プロピジウムなどの蛍光色素を用い、蛍光顕微鏡観察により

検出する方法も知られている〔バイオマニュアルUPシリーズ 新アポトーシス実験法、第2版〕。また、アポトーシスの過程で活性化される caspase の活性を測定する方法〔J. Exp. Med., 183, 1957-1964 (1996)〕、あるいは生細胞中のミトコンドリア内脱水素酵素活性を測定するMTTアッセイ法〔J. Immunol. Methods, 16, 55-63 (1983)〕のような生化学的方法もあげられる。さらに、Annexin Vを用いて細胞膜の構造変化を検出する方法〔J. Exp. Med., 182, 1545-1556 (1995)〕、TUNEL法、Burt on法〔バイオマニュアルUPシリーズ 新アポトーシス実験法、第2版〕などのDNA断片化に基づく検出法も知られている。

実施例

以下に実施例をあげて本発明を具体的に示すが、本発明はこれらの実施例に限定されないものとする。

実施例 1

ずり応力を負荷させたH U V E Cからのc D N Aライブラリーの作製

(1) H U V E Cの培養

10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン(5,000単位/ml)・ストレプトマイシン(5mg/ml)溶液(Life Technologies 社製)、0.003%のEndothelial Cell Growth Supplement(Becton Dickinson 社製)、0.01%のヘパリン(和光純薬社製)、および0.14%のNaHCO₃(Life Technologies 社製)を含むF-12K培地(大日本製薬社製)を用い、5%CO₂、37℃の条件で、H U V E Cの培養および継代を行った。H U V E CはClonetics 社から購入したものを用いた。

(2) H U V E Cへのずり応力負荷

10mlのPBS緩衝液に懸濁した0.2gのマイクロキャリア(C

y t o d e x 3 : Amersham Pharmacia Biotech 社製) を 5 0 m l の滅菌チューブに移し、室温で 1, 0 0 0 r p m、3 分間遠心分離後、上澄みを除き、F 1 2 K 培地を加えた。再度遠心分離して上澄みを除き、培地を加えて約 1 0 m l とした。

上記 (1) での培養で得られた H U V E C をトリプシン / E D T A で剥がし、約 2×10^6 個の H U V E C を 1 0 m l の培地に懸濁し、上述のマイクロキャリアと混合した。これを 2 0 0 m l 容のスピナーフラスコに移し、培地を 1 5 m l 加えて総容量を約 3 5 m l とした。5 0 ~ 6 0 r p m で 3 0 秒間攪拌し、その後 1 時間静置した。該攪拌、静置操作を 4 回繰り返すことにより H U V E C をマイクロキャリアに接着させた。1 6 0 r p m で一定時間攪拌することで、細胞にずり応力を負荷した。

(3) R N A の調製

上記 (2) の方法で、ずり応力を 0. 5 時間、1 時間、1. 5 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、1 0 時間、2 0 時間負荷させた H U V E C を、それぞれ 1.6×10^7 ずつ調製した。これらの細胞から、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)] により、全 R N A を調製した。ずり応力負荷時間の異なる、上記 9 種のサンプルについて、全 R N A 1 0 0 μ g ずつを混合し 9 0 0 μ g とした。全 R N A 9 0 0 μ g をオリゴ d T セルロースカラム (Collaborative Research 社製) に通過させることにより、ポリ (A) + R N A として m R N A 3 0. 9 μ g を取得した。

(4) c D N A ライブラリーの作製

上記 (3) で取得した m R N A 3. 0 μ g を用いて、リンカープライマー法 [「遺伝子ライブラリーの作製法」野島博編] に従い c D N A 合成、B a m H I アダプターの付加、N o t I による切断反応を行った。得られた 2 本鎖 c D N A を、プラスミドベクター p A P 3 n e o [Genes to Cells, 3, 459 (1998)] の B g 1 I I / N o t I 間にライゲーションすることにより、c D N A の 5' 端が常にベクターの B g 1 I I サ

イト側にあるようにした。得られたライゲーション反応液を用い、該プラスミドを大腸菌MC1061A〔モレキュラー・クローニング 第2版〕にエレクトロポレーション法により導入し、cDNAライブラリーを作製した。

実施例 2

サブトラクションライブラリーの作製

(1) 一本鎖DNAの調製

実施例1においてMC1061A内で増幅させて得られたcDNAライブラリーのプラスミド2 μ gを、エレクトロポレーション法により大腸菌XL1-Blue MRF' (Stratagene 社製) に導入した。4.5 mlのSOC培地〔モレキュラー・クローニング 第2版〕中、37℃で1時間激しく振とう培養した後、培養液全てを、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地〔モレキュラー・クローニング 第2版〕5.5 mlに加えた。37℃で5時間激しく振とう培養した後、培養液5 mlをアンピシリンを含む45 mlの2-YT培地〔モレキュラー・クローニング 第2版〕に植菌し、ここに 1×10^{11} pfuのヘルパーファージR408〔Gene, 45, 333 (1986)〕を加えた。37℃で12時間激しく振とう培養した後、培養液を滅菌チューブに移し、4℃で10,000 rpm、10分間遠心分離して大腸菌を沈殿させた。ファージを含む上澄みを新しい滅菌チューブに移し、再度遠心分離した。上澄みを孔径0.22 μ mの滅菌フィルター (Millipore 社製) に通し、大腸菌を完全に除いた。25 mlのファージ液あたり、10 \cdot DNaase緩衝液[100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM MgCl₂] 2.5 ml、20単位/ μ lのDNaase I (ニッポンジーン社製) 1 μ lを添加し、37℃で30分間反応させた。ここに1/4容の20%ポリエチレングリコール (分子量6,000) / 2.5 M NaClを加えてよく混合し、室温に20分間静置した。4℃で10,000 rpm

m、10分間遠心分離し、上澄みを完全に除いた。得られたファージの沈殿を、400 μ lのTE[10mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA(pH 8.0)]に溶解し、25mg/mlのProteinase Kを25 μ l、10%SDSを4 μ l加えて42℃で1時間反応させた。フェノール処理、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿を行った。得られたファージ1本鎖DNAの沈殿は、30 μ lのTEに溶解させた。

(2) RNAのビオチン化

ずり応力を負荷していない、即ちマイクロキャリアに接着させただけのHUVECから、実施例1と同様の方法によりポリ(A)⁺RNAを調製した。このRNA 30 μ gに蒸留水を加えて20 μ lとし、ここに1 μ g/ μ lのPHOTOPROBE biotin (Vector Laboratories 社製) 30 μ lを暗所で加えた。チューブの蓋を開けて氷上に置き、約10cmの高さから水銀ランプを20分間照射してビオチン化を行った後、50 μ lの100mM Tris-HCl(pH 9.5)/1mM EDTA(pH 8.0)を加えた。ここに100 μ lの水飽和ブタノールを加え、激しく攪拌した。4℃で14,000rpm、5分間遠心分離後、上層のブタノール層を除いた。この操作をあと2回繰り返した。水層に100 μ lのクロロホルムを加えて激しく攪拌し、4℃で14,000rpm、5分間遠心分離後、水層を新しいチューブに移した。この操作を再度繰り返した後、エタノール沈殿を行った。回収されたRNAの沈殿を20 μ lの蒸留水に溶解させ、ビオチン化の操作を繰り返した。ビオチン化したRNAは、ハイブリダイゼーションまでエタノール沈殿の状態で-80℃に保存した。

(3) 1本鎖DNAとRNAのハイブリダイゼーション

(2)で調製したビオチン化RNA 20 μ gを4℃、14,000rpm、15分間の遠心分離で回収し、8 μ lの蒸留水に溶解した。ここに、2×反応用緩衝液[80%ホルムアミド、100mM HEPES

(pH 7.5)、2 mM EDTA (pH 8.0)、0.2% SDS] 12.5 μ l、2.5 M NaCl を 2.5 μ l、1 μ g/ μ l のポリ (A) (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を 1 μ l、および (1) で調製した、ずり応力を負荷した HUV EC 由来の cDNA ライブラリーの 1 本鎖 DNA を 1 μ l (0.5 μ g/ μ l) 加え、総容量を 25 μ l とした。65°C で 10 分間加熱した後、速やかに 42°C のヒートブロックに移した。2 晩、42°C で保温して、ハイブリダイゼーションを行った。

(4) サブトラクション、再ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの終了した反応液に 400 μ l の緩衝液 [50 mM NaCl、50 mM HEPES (pH 7.5)、2 mM EDTA (pH 8.0)] を加え、ここに 2 μ g/ μ l のストレプトアビジン (Life Technologies 社製) 5 μ l を加えて混合した。室温に 5 分間置いた後、フェノール・クロロホルム処理を行った。水層を新しいチューブに移し、新たに 5 μ l のストレプトアビジンを加えた。室温に 5 分間置いた後、フェノール・クロロホルム処理を 2 回、クロロホルム処理を 1 回行うことで、サブトラクションを行った。水層をミリポアフィルター UFCP3TK50 (Millipore 社製) の上室にのせ、溶液が全て下室に流れ落ちるまで 4°C、10,000 rpm で遠心分離した。下室の溶液を除き、上室に 300 μ l の TE を加え遠心分離することでフィルターを洗浄した。この操作を繰り返した後、フィルターに捕獲された 1 本鎖 DNA を 30 μ l の 1/10 TE で回収した。これを真空乾燥させ、蒸留水を加えて 9 μ l とした。(2) で調製したビオチン化 RNA 10 μ g をエタノール沈殿させた後遠心分離して回収し、沈殿に上記 1 本鎖 DNA 溶液 9 μ l を加えた。ここに 12.5 μ l の 2×反応用緩衝液、2.5 μ l の 2.5 M NaCl、1 μ l のポリ (A) を加え、(3) と同様にして 2 回目のハイブリダイゼーションを行った後、上述した方法でサブトラクションを行った。以下、同様に 1 本鎖 DNA を回収し、

10 μ g のビオチン化RNAとハイブリダイズさせて3回目のサブトラクションを、5 μ g のビオチン化RNAを用い4回目のサブトラクションを行った。

(5) 2本鎖DNAの合成、大腸菌への導入

上記のように4回連続してサブトラクションを行った後、得られた1本鎖DNAを30 μ lの1/10 TEに回収した。このうち15 μ lに、蒸留水14 μ l、2 μ g/ μ lの配列番号159記載の塩基配列を有するプライマー伸長用プライマー1 μ lを加え、65℃で10分間加熱した。室温に5分間置いてプライマーを1本鎖DNAにアニーリングさせた後、10×反応緩衝液 (BcaBEST Dideoxy Sequencing Kitに添付のもの、宝酒造社製) 5 μ l、1 mM dNTP 混合液10 μ l、3 μ g/ μ lの1本鎖DNA結合タンパク質 (USB社製) 0.5 μ l、2単位/ μ lの BcaBEST DNA polymerase (宝酒造社製) 2 μ l、蒸留水2.5 μ lを加えた。65℃で1時間反応させ、2本鎖DNAを合成した。該反応液に50 μ lの蒸留水を加え、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理を行った。ミリポアフィルターUFCP3TK50を用いて溶液を濃縮し、最終的に20 μ lのTEで2本鎖DNAを溶解した。このうち1/5量を用い、大腸菌MC1061Aにエレクトロポレーション法により該2本鎖DNAを導入した。

(6) リバースサブトラクション

(5) において得られた2本鎖DNAを導入した大腸菌MC1061Aを培養し、該大腸菌からプラスミドDNAを調製した。これを(1)の場合と同様にして大腸菌XL1-Blue MRF'に導入し、1本鎖DNAを調製した。ずり応力を負荷したHUVEC由来のmRNA 2 μ gを(2)の方法にしたがってビオチン化し、上述の1本鎖DNA 2 μ gと混合した。ここに2×反応用緩衝液12.5 μ l、2.5 M NaClを2.5 μ l、1 μ g/ μ lのポリ(A)を1 μ l、および蒸留水を加え、総容量を25 μ lとした。(3)の場合と同様、42℃で2晩、

ハイブリダイゼーションを行った。400 μ l の緩衝液〔500 mM NaCl、50 mM HEPES (pH 7.5)、2 mM EDTA (pH 8.0)〕を加え、ここに2 μ g/ μ l のストレプトアビジン7 μ l を加えて混合した。室温に5分間置いた後、フェノール・クロロホルムを加え、激しく混合した。室温で14,000 rpm、7分間遠心分離後、水層を除いた。ここに新たに400 μ l のTEを加えて激しく混合し、室温で14,000 rpm、7分間遠心分離後、水層を除いた。この操作をあと2回繰り返すことで、ビオチン化RNAとハイブリダイズしなかった1本鎖DNAを除去した。400 μ l のTEを加え、混合はせずにチューブの蓋を開けた状態で95℃、5分間加熱した。この後、氷上に5分間置いて変性させることで、フェノール・クロロホルム層にあった、ビオチン化RNAとハイブリダイズしていた1本鎖DNAをビオチン化RNAから外した。激しく混合して室温で14,000 rpm、7分間遠心分離後、水層を新しいチューブに移した。再度フェノール・クロロホルム処理を行った後、クロロホルム処理を行った。1本鎖DNAを含む水層をミリポアフィルターUFCP3TK50を用いて濃縮し、最終的に30 μ l の1/10 TEで1本鎖DNAを回収した。このうち15 μ l を真空乾燥させ、蒸留水を加えて9 μ l とした。ずり応力を負荷していないHUV EC由来のmRNA 5 μ gをビオチン化し、エタノール沈殿により回収し、沈殿に上記1本鎖DNA溶液9 μ lを加えた。ここに12.5 μ l の2・反応用緩衝液、2.5 μ l の2.5 M NaCl、1 μ l のポリ(A)を加え、(3)、(4)と同様にして通常のスブトラクションを行った。

即ち、4回連続してスブトラクションを行い、リバーススブトラクションを1回、さらに通常のスブトラクションを1回行うことで、HUV ECにおいてずり応力負荷に伴い発現上昇する遺伝子が濃縮されたスブトラクションライブラリーを作製した。

実施例 3

ノーザンハイブリダイゼーションによる発現変動クローンの取得

実施例 2 で得られたサブトラクションライブラリー中に含まれる、ずり応力依存的に発現上昇するクローンを選択するため、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。

(1) RNA のメンブレンへの転写

ずり応力を負荷した H U V E C、あるいは負荷しない H U V E C から実施例 1 と同様の方法により得られた全 RNA 4 μ g に、それぞれ蒸留水を加え 1.8 μ l とした。ここに 10 \times M O P S 緩衝液 [80 mM 酢酸ナトリウム、197 mM M O P S、10 mM E D T A (pH 8.0)] 0.8 μ l、35%ホルムアルデヒド溶液 (ナカライテスク社製) 1.4 μ l、脱イオン化ホルムアミド 4 μ l を加えた。65℃で15分間加熱した後、氷上に5分間置いて急冷し、全量を 1 \times M O P S / 2%ホルムアルデヒド / 1%アガロースゲルで電気泳動した。泳動終了後、ゲルを蒸留水で20分間ずつ3回洗うことによりゲルからホルムアルデヒドを除いた。20 \times S S C [3M N a C l、0.3M クエン酸ナトリウム] に30分間浸した後、20 \times S S C を用いたキャピラリートランスファー法により、ゲル中の RNA をナイロンメンブレン B i o d y n e A (Pall BioSupport 社製) に転写した。転写終了後、メンブレンを 80℃で2時間置くことにより、RNA をメンブレンに固定した。

(2) プローブのラベル化

実施例 2 で得られたサブトラクションライブラリー中、挿入 DNA 断片が 0.4 kb 以上であるクローンについて、プラスミドを S m a I と N o t I で切断し、挿入 DNA 断片を切り出した。断片の精製には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用い、方法はキットに添付のマニュアルに従った。精製した DNA 断片 50 ng 程度を鋳型とし、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (宝酒造社製)、および [α - 32 P]d C T P (110 T B q / m m o l ; Amersham Pharmacia

Biotech 社製)を用いて該DNA断片をラベルし、プローブとして用いた。方法はキットに添付のマニュアルに従った。

(3) ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィー

(1) で作製したメンブレンをハイブリバッグに入れ、直前に調製したハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド、5×Denhardt's、5×SSC、0.1%SDS、変性サケDNA (0.1mg/ml)] を加えた。42℃で2時間以上保温し、プレハイブリダイゼーションを行った。(2)で調製したプローブを95℃で5分間加熱後、急冷し、変性させた。これをハイブリダイゼーション液と混合し、プレハイブリダイゼーションの終了したメンブレンに加えた。42℃で24時間以上保温し、ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンをハイブリバッグから取り出し、2×SSC/0.1%SDS中、室温で10分間ゆっくりと振とうしてハイブリダイゼーション液をできるだけ除いた。次に0.15×SSC/0.1%SDS中、42℃で30分間ずつ2回洗浄した。洗浄操作の終了したメンブレンをX線フィルムに感光させ、オートラジオグラフィーを行った。全部で1026個のクローンの各々をA4RS-1～A4RS-1026と名付け、各々のクローンについてノーザンハイブリダイゼーションを行い、107個のずり応力依存的に発現が上昇するクローンを得た。

実施例 4

発現変動クローンの同定

(1) 塩基配列の決定

実施例 3 においてずり応力負荷により発現が上昇することが確認されたクローンに関して、377 DNA シークエンサー (Perkin Elmer 社製) を用いて塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定は、Perkin Elmer 社のダイプライマーサイクルシークエンシングキットを用いた。方法はキットに添付のマニュアルに従った。得られた塩基配列をデ

ータベース G e n B a n k と比較することで、発現変動クローンの同定を行った。その結果、107個のクローンは88種類の遺伝子に分類された。88種類の中には、血管内皮細胞においてずり応力刺激により発現誘導されることが報告されている5種類の遺伝子、endothelin-1、monocyte chemotactic protein-1、heparin-binding EGF-like growth factor、thrombomodulin、transforming growth factor- β をコードする遺伝子が含まれていた。したがって、血管内皮細胞においてずり応力刺激により発現誘導されることがこれまで報告されていない83種類の遺伝子を同定することができた。これらのうち、既知遺伝子は55種類であり、28種類は新規遺伝子であった。公知の配列中に一致する完全長 c D N A が存在せず expressed sequence tag (E S T) とのみ一致するもの、あるいは公知の配列中に一致する配列が全くないもの、即ち新規遺伝子に関しては、相当する U n i G e n e に含まれる E S T を全て連結させ、出来るだけ長い配列をコンピュータ上で作製した。新規遺伝子中8種類については、後述する実施例5において λ ファージベクターで作製した c D N A ライブラリーから完全長 c D N A をクローン化した。

(2) ずり応力依存的発現上昇を示す既知遺伝子

A 4 R S - 0 1 6 の塩基配列を決定したところ、これは thioredoxin reductase の配列 [Accession: X91247] (配列番号1) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号2に示した。thioredoxin reductase は、N A D P H を用い thioredoxin を還元する酵素であり、細胞内抗酸化制御、シグナル伝達、NO産生など、様々な生理的反応に関与する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン1と図3のレーン1に示した。

A 4 R S - 0 2 6 の塩基配列を決定したところ、これは lipopolysaccharide-induced protein gene の配列 [Accession: Q51544] (配列番号3) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号4に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、他

の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さず、機能も未知である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン2に示した。

A 4 R S - 0 4 0 の塩基配列を決定したところ、これは spliceosome-associated protein(SAP145)の配列 [Accession: U41371] (配列番号 5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 6 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン3に示した。

A 4 R S - 0 4 1 の塩基配列を決定したところ、これは human proline-rich membrane protein(PRMP)の配列 [Accession: V50494] (配列番号 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 8 に示した。PRMPは配列のみデータベースに登録されておりその機能は不明であるが、ラット neural membrane protein 35(NMP35) [Molecular and Cellular Neuroscience, 11, 260 (1998)]、NMDA受容体のグルタミン酸結合サブユニット [Accession: W62612] と顕著な相同性を示す。NMP35は、その機能は明らかにされていないが、NMDA受容体のグルタミン酸結合サブユニットと同様、脳特異的に発現しており、アミノ酸配列から推定される親水性の解析から膜蛋白質と推定されている。PRMPもまた、極めて疎水性が高いことから、膜蛋白質として機能する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン4と図3のレーン2に示した。

A 4 R S - 0 6 3 の塩基配列を決定したところ、これは puromycin-sensitive aminopeptidase の配列 [Accession: AJ132583] (配列番号 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 10 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン5と図3のレーン3に示した。

A 4 R S - 0 9 6 の塩基配列を決定したところ、これは human secreted protein gene 125 clone HSPAG15 の配列 [Accession: V59635]

(配列番号 1 1) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 に示した。この遺伝子は配列のみバンクに登録されており、その機能は未知である。この遺伝子がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 6 と図 3 のレーン 4 に示した。

A 4 R S - 1 1 6 の塩基配列を決定したところ、これは *l a m i n C* の配列 [Accession: M13451] (配列番号 1 3) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 4 に示した。*l a m i n C* は、核膜の裏打ち蛋白質であり、細胞骨格形成因子のひとつである。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 7、図 3 のレーン 5 に示した。

A 4 R S - 1 2 6 の塩基配列を決定したところ、これは cytokine-response gene CR8 の配列 [Accession: T43383] (配列番号 1 5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 6 に示した。cytokine-response gene CR8 は、別名 *D E C 1* ともいい、basic helix-loop-helix モチーフを有する転写因子である。特に、神経分化に関与する *H E S* ファミリーの転写因子群と相同性が高い。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 8 に示した。

A 4 R S - 1 3 1 の塩基配列を決定したところ、これは human enhancer of filamentation (HEF1) の配列 [Accession: L43821] (配列番号 1 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 8 に示した。*H E F 1* は、*S H 3* ドメインを有し *F A K* と結合する活性を持つ、細胞骨格制御に関与するシグナル伝達分子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 9 に示した。

A 4 R S - 1 4 8 の塩基配列を決定したところ、これは interferon-induced 15-kDa protein gene の配列 [Accession: M21786] (配列番号 1 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 2 0 に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、他の既

知のタンパク質と顕著な相同性を示さず、機能も未知である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン10に示した。

A 4 R S - 1 5 4 の塩基配列を決定したところ、これはLDL受容体の配列 [Accession: N60388] (配列番号21) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号22に示した。LDL受容体は、動脈硬化病変形成の原因のひとつであるLDLを内皮下に取り込む。培養ウシ大動脈内皮細胞にずり応力を負荷することで、LDL受容体を介したLDLの結合、取り込みが増加することが報告されている [Circulation, 76, 648 (1987)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン11に示した。

A 4 R S - 1 7 4 の塩基配列を決定したところ、これは peripheral myelin protein(PMP)-22 の配列 [Accession: Q32869] (配列番号23) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号24に示した。PMP-22は末梢神経系に存在するミエリンの構成因子であり、4つの膜貫通ドメインを有する膜タンパク質である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン12に示した。

A 4 R S - 1 7 5 の塩基配列を決定したところ、これはチロシンキナーゼ (tyrosine kinase) 受容体 U F O / A r k の配列 [Accession: S65125] (配列番号25) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号26に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン13に示した。

A 4 R S - 1 9 4 の塩基配列を決定したところ、これは calcium-ATPase HK2 の配列 [Accession: M23115] (配列番号27) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号28に示した。calcium-ATPase HK2は、細胞内の小胞体膜に存在する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン14に示した。

A 4 R S - 1 9 7 の塩基配列を決定したところ、これは human arginine-rich protein の配列 [Accession: M83751] (配列番号29)

と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 30 に示した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さず、その機能は未知であるが、原癌遺伝子の一種である可能性が示唆される。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 15 に示した。

A4RS-260 の塩基配列を決定したところ、これは KIAA0025 の配列 [Accession: D14695] (配列番号 31) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 32 に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さず、機能も未知である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 16、図 3 のレーン 6 に示した。

A4RS-271 の塩基配列を決定したところ、これは human high-mobility group phosphoprotein isoform I-C(HMGI-C) の配列 [Accession: U28749] (配列番号 33) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 34 に示した。HMGI-C はその構造から転写因子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 17、図 3 のレーン 7 に示した。

A4RS-307 の塩基配列を決定したところ、これは PRAD1 の配列 [Accession: X59798] (配列番号 35) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 36 に示した。PRAD1 は cyclin ファミリーの一つで cyclin D1 とも呼ばれる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 18、図 3 のレーン 8 に示した。

A4RS-355 の塩基配列を決定したところ、これは KIAA0964 の配列 [Accession: AB023181] (配列番号 37) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 38 に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、ラット PSD-95/SAP90-associated protein-4(SAPAP-4)のヒトオーソログと判断される。SAPAP-4 は

膜に存在し、NMDA受容体のクラスタリングに関与すると考えられている。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン19に示した。

A4RS-389の塩基配列を決定したところ、これはlamin Aの配列 [Accession: M13452] (配列番号39) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号40に示した。lamin Aは、核膜の裏打ち蛋白質であり、細胞骨格形成因子のひとつである。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のパネル20、図3のパネル9に示した。

A4RS-391の塩基配列を決定したところ、これは non-muscle alpha actinin の配列 [Accession: U48734] (配列番号41) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号42に示した。alpha actinin は、細胞骨格形成因子のひとつである。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン21、図3のレーン10に示した。

A4RS-423の塩基配列を決定したところ、これは gamma-filamin の配列 [Accession: AF089841] (配列番号43) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号44に示した。gamma-filamin は actin filament crosslinking protein であり、rac、rhoなどの低分子量GTP結合タンパク質と結合することで filopodia 形成に関与する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図1のレーン22に示した。

A4RS-431の塩基配列を決定したところ、これは growth factor inducible immediate early gene product CYR61 の配列 [Accession: U62015] (配列番号45) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号46に示した。CYR61は、別名 g1g1、monocyte mature differentiation factor、connective tissue growth factor-2とも呼ばれ、アミノ末端にシグナル配列を有する分泌因子である。ずり

応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 2 3 に示した。

A 4 R S - 4 5 3 の塩基配列を決定したところ、これは nuclear factor of activated T cells (N F - A T c) の配列 [Accession: U08015] (配列番号 4 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 4 8 に示した。N F - A T c は転写因子の構成因子のひとつである。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 2 4 に示した。

A 4 R S - 4 9 2 の塩基配列を決定したところ、これは G L I Kruppel-related protein の配列 [Accession: M77698] (配列番号 4 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 5 0 に示した。G L I - Kruppel related protein は、別名 Y Y 1 と呼ばれ、抑制的に機能する転写因子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 2 5 に示した。

A 4 R S - 5 0 7 の塩基配列を決定したところ、これは human mRNA homologous to the p64 bovine chloride channel の配列 [Accession: Y12696] (配列番号 5 1) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 5 2 に示した。この遺伝子は配列のみが報告されており、機能は明らかでない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 2 6 に示した。

A 4 R S - 5 1 4 の塩基配列を決定したところ、これは K I A A 0 0 8 0 の配列 [Accession: D38522] (配列番号 5 3) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 5 4 に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、膜タンパク質であるラット synaptotagmin XI のヒトオーソログと判断される。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 2 7 に示した。

A 4 R S - 5 2 3 の塩基配列を決定したところ、これは nicotinamide N-methyltransferase の配列 [Accession: U08021] (配列番号 5 5)

と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 56 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 28 に示した。

A4RS-544 の塩基配列を決定したところ、これは *H.sapiens* mRNA for surface glycoprotein の配列 [Accession: Z50022] (配列番号 57) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 58 に示した。この遺伝子がコードするタンパク質は I 型の膜タンパク質である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 29 に示した。

A4RS-547 の塩基配列を決定したところ、これは early growth response gene alpha (EGR-alpha) の配列 [Accession: S81439] (配列番号 59) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 60 に示した。EGR-alpha は転写因子であり、そのホモログの EGR-1 は内皮細胞においてずり応力により活性化することが報告されている [Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 2280, (1997)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 30 に示した。

A4RS-557 の塩基配列を決定したところ、これは SF2p33 の配列 [Accession: M69040] (配列番号 61) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 62 に示した。SF2p33 は核内因子であり、pre-mRNA のスプライシングに必須である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 31 に示した。

A4RS-577 の塩基配列を決定したところ、これは p66 shc の配列 [Accession: U73377] (配列番号 63) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 64 に示した。shc はチロシンキナーゼからの刺激を ras へ伝達する、シグナル伝達分子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 32

に示した。

A 4 R S - 5 8 8 の塩基配列を決定したところ、これは lysosomal acid lipase (L A L) の配列 [Accession: M74775] (配列番号 6 5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 6 6 に示した。L A L は別名 cholesteryl esterase で、細胞内に取り込まれた cholesteryl ester を加水分解する酵素である。この遺伝子が欠損すると cholesteryl ester storage disease となり動脈硬化の原因となる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 3 に示した。

A 4 R S - 6 0 2 の塩基配列を決定したところ、これは N^G, N^G -dimethylarginine dimethylaminohydrolase (D D A H) の配列 [Accession: AB001915] (配列番号 6 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 6 8 に示した。D D A H は N^G -mono-methyl-L-arginine (M M A) と N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (D M A) を c i t r u l l i n に加水分解する。M M A と D M A は N O 合成酵素の基質アナログであることから、N O の合成を阻害する。即ち、D D A H は N O 合成を間接的に誘導する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 4、図 3 のレーン 1 1 に示した。

A 4 R S - 6 0 8 の塩基配列を決定したところ、これは serum deprivation response (S D P R) の配列 [Accession: AF085481] (配列番号 6 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 7 0 に示した。ヒト S D P R は配列が登録されているのみであるが、マウスオーソログである s d r は、N I H 3 T 3 において血清飢餓により誘導発現することが報告されている。しかし、その機能は未知である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 5 に示した。

A 4 R S - 6 1 2 の塩基配列を決定したところ、これは regulator of G protein signaling (R G S 3) の配列 [Accession: U27655] (配列

番号 7 1) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 7 2 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 パネル 3 6 に示した。

A 4 R S - 6 2 5 の塩基配列を決定したところ、これは cytokine-inducible nuclear protein C - 1 9 3 の配列 [Accession: X83703] (配列番号 7 3) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 7 4 に示した。この遺伝子は内皮細胞において T N F - α 、L P S などの炎症刺激に伴って発現する。この遺伝子がコードするアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さないが、核内因子であることは証明されている。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 7 に示した。

A 4 R S - 6 6 6 の塩基配列を決定したところ、これは laminin B1 chain の配列 [Accession: M61916] (配列番号 7 5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 7 6 に示した。laminin B1 chain は糖タンパク質であり、細胞外マトリクス的一种である。ウシ動脈内皮細胞において、ずり応力負荷による laminin タンパク質の増加が報告されている [Laboratory Investigation, 73, 565 (1995)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 8 に示した。

A 4 R S - 6 6 8 の塩基配列を決定したところ、これは m a t r i x G l a p r o t e i n (M G P) の配列 [Accession: M58549] (配列番号 7 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 7 8 に示した。M G P は細胞外マトリクス的一种であり、この遺伝子のノックアウトマウスは動脈と軟骨での石灰化が生じ致死になることが報告されている [Nature, 386, 78 (1997)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 3 9 に示した。

A 4 R S - 6 7 4 の塩基配列を決定したところ、これは P T X 3 (配列番号 7 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列

番号 80 に示した。PTX3 は p e n t r a x i n ファミリーの一環であり、アミノ末端にシグナル配列を有する分泌因子である。血管内皮細胞、単球において、IL-1 や TNF- α などの炎症性刺激により発現することが報告されている。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 40 に示した。

A4RS-682 の塩基配列を決定したところ、これは connective tissue growth factor の配列 [Accession: X78947] (配列番号 81) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 82 に示した。connective tissue growth factor は、アミノ末端側にシグナル配列を有する分泌因子であり、発達した動脈硬化巣での発現が報告されている [Circulation, 95, 831 (1997)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 1 のレーン 41 に示した。

A4RS-751 の塩基配列を決定したところ、これは FLI-1 の配列 [Accession: Q50644] (配列番号 83) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 84 に示した。FLI-1 は、ERGB と呼ばれ、ETS ファミリーに属する転写因子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 42 に示した。

A4RS-781 の塩基配列を決定したところ、これは HLA-E の配列 [Accession: X56841] (配列番号 85) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 86 に示した。HLA-E は MHC class I タンパク質の一環である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 43 に示した。

A4RS-784 の塩基配列を決定したところ、これは plasminogen activator inhibitor (PAI) の配列 [Accession: M16006] (配列番号 87) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 88 に示した。PAI は、plasminogen activator と拮抗的に働く。ずり応力負荷によりその発現が減少するという報告がある [Blood, 87, 2314

(1996))。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン44、図3のレーン12に示した。

A4RS-817の塩基配列を決定したところ、これは keratin 18の配列 [Accession: M26326] (配列番号89)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号90に示した。keratin 18は中間フィラメントの一種である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン45に示した。

A4RS-818の塩基配列を決定したところ、これは human secreted protein gene 5 clone HELDY41の配列 [Accession: V34315] (配列番号91)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号92に示した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列は、human hedgehog interacting protein [Accession: W56538]の部分配列と一致している。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン46に示した。

A4RS-914の塩基配列を決定したところ、これは monocyte-derived neutrophil-activating protein (MONAP)の配列 [Accession: M26383] (配列番号93)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号94に示した。MONAPは別名 interleukin 8(IL-8)であり、動脈硬化の発症との関連性が強く示唆されている。実際に動脈硬化プラークのマクロファージにおいてmRNAレベル、タンパク質レベルでの強い発現が報告されている [Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol., 16, 1007 (1996)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン47に示した。

A4RS-929の塩基配列を決定したところ、これは MUC18 glycoproteinの配列 [Accession: M28882] (配列番号95)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号96に示した。MUC18はMel-CAM、あるいはCD146とも呼ばれ、免疫グロブリン様ドメインを有する細胞接着因子である。ずり応力依存的発現上

昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン48に示した。

A4RS-935の塩基配列を決定したところ、これは nuclear speckle-type protein(SPOP)の配列 [Accession: AJ000644] (配列番号97)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号98に示した。SPOPはスプライシング因子と相互作用すると考えられる核内因子である。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン49に示した。

A4RS-938の塩基配列を決定したところ、これは thrombospondin(TSP)の配列 [Accession: X14787] (配列番号99)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号100に示した。TSPは細胞外マトリクスとして機能する糖タンパク質であり、癌化、血管新生を阻害する作用を有する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン50に示した。

A4RS-939の塩基配列を決定したところ、これは caveolin の配列 [Accession: Z18951] (配列番号101)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号102に示した。caveolinは細胞膜に存在する caveolae の主要構成因子であり、nitric oxide(NO)synthase と相互作用することでNO産生制御に関与することが報告されている [J. Biol. Chem., 273, 34724(1998)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン51に示した。

A4RS-945の塩基配列を決定したところ、これは human BENE mRNA の配列 [Accession: U17077] (配列番号103)と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号104に示した。BENEはT cell surface glycoprotein MALと相同性を有する膜タンパク質である。内皮細胞において、酸化リポタンパク質の構成因子である lysophosphatidyl choline(lysoPC)により発現上昇することから、動脈硬化との関連性が示唆されている [J. Biochemistry, 123, 1119(1998)]。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2の

レーン 5 2 に示した。

A 4 R S - 9 4 7 の塩基配列を決定したところ、これは 1,4- α -glucan branching enzyme の配列 [Accession: L07956] (配列番号 1 0 5) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 0 6 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 3 に示した。

A 4 R S - 9 4 8 の塩基配列を決定したところ、これは ferritin H の配列 [Accession: M11146] (配列番号 1 0 7) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 0 8 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 4 に示した。

A 4 R S - 9 4 9 の塩基配列を決定したところ、これは human PAST (HPAST) の配列 [Accession: AF001434] (配列番号 1 0 9) と一致した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 1 0 に示した。H P A S T は、ハエ由来の糖タンパク質である P A S T - 1 と相同性を有する。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 5 に示した。

(3) ずり応力依存的発現上昇を示す部分長新規遺伝子

A 4 R S - 0 1 1 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.71475 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 1 1 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 1 2 に示した。この配列がコードするアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 6 に示した。

A 4 R S - 1 1 5 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.3742 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 1 3 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 1 4 に示した。この遺伝子はラット

S E C 6 1 [Accession: M96630] と非常に高い相同性を示し、ヒトのオーソログと考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 7、図 3 のレーン 1 3 に示した。

A 4 R S - 1 4 3 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.5307 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 1 5 に示した配列を得ることができた。この配列中には 5 0 アミノ酸以上から成る O R F が存在せず、非翻訳領域と考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 8、図 3 のレーン 1 4 に示した。

A 4 R S - 1 7 1 の塩基配列を決定したところ、これと完全一致する配列はデータバンク中に存在しなかった。塩基配列を配列番号 1 1 6 に示した。この配列中には 5 0 アミノ酸以上から成る O R F が存在せず、非翻訳領域と考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 5 9 に示した。

A 4 R S - 1 9 3 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.112157 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 1 7 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 1 8 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 0、図 3 のレーン 1 5 に示した。

A 4 R S - 2 8 0 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.109017 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 1 9 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 0 に示した。この遺伝子はヒト ras-like protein TC10 [Accession: M31470] と 8 7 % の高い相同性を示し、新規ヒト低分子量 G T P 結合タンパク質と考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 1、図 3 のレーン 1

6 に示した。

A 4 R S - 4 0 2 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.181077 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 2 1 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 2 に示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 2、図 3 のレーン 1 7 に示した。

A 4 R S - 5 3 3 の塩基配列を決定したところ、これは E S T クローン、R07925、T86046 と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 2 3 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 4 に示した。この配列がコードするアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 3 に示した。

A 4 R S - 6 0 4 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.34160 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 2 5 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 6 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 4、図 4 のレーン 1 8 に示した。

A 4 R S - 6 1 5 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.193974 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 2 7 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 2 8 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と有意な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 6 5 に示した。

A 4 R S - 6 1 9 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene

する E S T を連結することができた。この配列中に非翻訳領域と考えられロットを、図 2 のレーン

ろ、これと完全一致する配列を配列番号 1 3 0 に成る O R F が存在せず、上昇を示すノーザンブローに示した。

ところ、これは UniGene する E S T を連結することができた。この配列中に、非翻訳領域と考えられロットを、図 2 のレーン

ろ、これと完全一致する配列を配列番号 1 3 2 に成る O R F が存在せず、上昇を示すノーザンブロー

ろ、これと完全一致する配列を配列番号 1 3 3 に成る O R F が存在せず、上昇を示すノーザンブロー

ところ、これは UniGene する E S T を連結するこ

とで、配列番号 1 3 4 に示した配列を得ることができた。この配列中には 5 0 アミノ酸以上から成る O R F が存在せず、非翻訳領域と考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 1 に示した。

A 4 R S - 8 2 6 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.7348 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 3 5 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 3 6 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 2 に示した。

A 4 R S - 9 1 6 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.105695 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 3 7 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 3 8 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 3、図 4 のレーン 2 0 に示した。

A 4 R S - 9 3 3 の塩基配列を決定したところ、これは E S T クローン AI391599 と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 3 9 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 4 0 に示した。この配列がコードするタンパク質は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 4 に示した。

A 4 R S - 9 4 3 の塩基配列を決定したところ、これは UniGene Hs.186838 に含まれる E S T 群と一致した。一致する E S T を連結することで、配列番号 1 4 1 に示した配列を得ることができた。この配列がコードするアミノ酸配列を配列番号 1 4 2 に示した。この配列がコード

するアミノ酸配列は zinc finger モチーフを有し、トリ由来 zinc finger 5 protein [Accession: U51640] 67% の相同性を示した。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のレーン75に示した。

実施例 5

完全長 cDNA のクローン化

実施例3において取得した、ずり応力依存的に発現上昇する新規DNAは、ほとんどの場合、そのインサートの長さがノーザンブロッティングで検出される mRNA の大きさより顕著に短かった。即ち、サブトラクションライブラリーから得られたクローンは、全長 cDNA ではなく部分 cDNA 断片であると判断された。そこで、新規DNAのうち8種類について、それらの全長 cDNA を cDNA ライブラリーから取得し直した。

(1) λ ファージベクターを用いた cDNA ライブラリーの作製

実施例1において取得した HUVEC 由来ポリ(A)⁺RNA 4.8 μ g に、オリゴ(dT)-XhoI プライマー(配列番号160) 3.2 μ g を加え、蒸留水を加えて 6.8 μ l とした。70℃で10分間加熱後、氷上に移し急冷した。該溶液に、5×逆転写酵素反応緩衝液(酵素に添付されていたもの) 4 μ l、100 mM DTT を 2 μ l、dNTP 混合液[10 mM dATP、10 mM dGTP、10 mM dTTP、5 mM 5-methyl dCTP] を 1.2 μ l、トレーサーとして [α -³²P]dATP (110 TBq/mmol; Amersham Pharmacia Biotech 社製) 1 μ l を氷上で添加した。37℃で2分間保温後、逆転写酵素 Superscript II RNaseH⁻ Reverse transcriptase 5 μ l (1,000 単位; Life Technologies 社製) を添加し、44℃で1時間反応させて cDNA を合成した。該反応液に 0.8 μ l の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を止め、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿により cDNA と

mRNAのハイブリッドを回収した。沈殿を $17\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解させ、ここに $5\mu\text{l}$ の $5\times$ 反应用緩衝液（酵素に添付のもの）、 $2.5\mu\text{l}$ の $100\mu\text{M}$ dGTP、および 15 単位/ μl の Terminal deoxynucleotidyl transferase (Life Technologies 社製) を $0.5\mu\text{l}$ 添加した。 37°C で 30 分間反応させ、cDNAの $3'$ 末端にオリゴdGを付加した。該反応液に $5\mu\text{l}$ の 0.5M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を止め、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を $20.7\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解させ、反应用緩衝液A [200mM Tris·HCl (pH 8.75)、 100mM KCl、 100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 20mM MgSO_4 、 1% Triton X-100、 $1\text{mg}/\text{ml}$ BSA] $1.5\mu\text{l}$ 、反应用緩衝液B [200mM Tris·HCl (pH 9.2)、 600mM KCl、 20mM MgCl_2] $1.5\mu\text{l}$ 、オリゴ(dC) NotI プライマー（配列番号161） $0.3\mu\text{g}$ 、 10mM dNTP混合液 $0.75\mu\text{l}$ 、 10mM $\beta\text{-NAD}$ $1.5\mu\text{l}$ を加えて総容量を $27.45\mu\text{l}$ とした。 55°C で 5 分間保温した後、 5 単位/ μl のExTaq DNA polymerase（宝酒造社製） $1.5\mu\text{l}$ 、 100 単位/ μl のAmpligase（Epicentre 社製） $0.75\mu\text{l}$ 、 5 単位/ μl のHybridase（Epicentre 社製） $0.3\mu\text{l}$ を添加した。サーマルサイクラーDNA engine（MJ Research 社製）を用い、 1 分間あたり 0.3°C の速度で、 55°C から 35°C までゆっくりと温度を下げ、その後 35°C で 15 分間保温してプライマーを鋳型1本鎖cDNAにアニーリングさせた。その後 72°C で 15 分間保温し第2ストランドDNAの伸長反応を行った。このアニーリング、伸長反応のサイクルをあと3回繰り返すことで、mRNAを分解しcDNAを2本鎖にした。該反応液に 0.5M EDTA (pH 8.0) $0.5\mu\text{l}$ 、 10% SDSを $0.5\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のProteinase Kを $0.5\mu\text{l}$ 添加して 45°C で 15

分間保温し、反応を停止して酵素を失活させた。フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿を $44\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解させた。ここに $10\times$ 反応用緩衝液（酵素に添付のもの） $5\mu\text{l}$ 、XhoI（ 10 単位/ μl ；宝酒造社製） $1\mu\text{l}$ を添加し、 37°C で 2 時間反応させ、オリゴ（dT）-XhoI プライマー内の XhoI サイトを切断した。該反応液に 5M NaCl を $0.5\mu\text{l}$ 、NotI（ 10 単位/ μl ；宝酒造社製） $1\mu\text{l}$ を添加し、 37°C で 2 時間反応させてオリゴ（dC）NotI プライマー内の NotI サイトを切断した。 400bp 以下の短い cDNA および未反応のプライマーとヌクレオチドを除くため、TE 緩衝液で平衡化させた *Size Sep-400* スパンカラム（Amersham Pharmacia Biotech 社製）に該反応液を乗せて 400g で 2 分間遠心分離し、溶出液をフェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理により精製した。クローニングベクター λ ZAP II（Stratagene 社製） $5\mu\text{g}$ （ $5\mu\text{l}$ ）に $10\times$ 反応用緩衝液（宝酒造社製） $8\mu\text{l}$ 、蒸留水 $62\mu\text{l}$ 、XhoI 50 単位（ $5\mu\text{l}$ ）を添加し、 37°C で 4 時間反応させた。該反応液に、 5M NaCl $1\mu\text{l}$ と NotI 50 単位（ $5\mu\text{l}$ ）を添加して 37°C でさらに 4 時間反応させ、ベクターの XhoI サイトと NotI サイトを切断した。該反応液に、 $10\times$ 反応用緩衝液（酵素に添付のもの） $9\mu\text{l}$ 、 0.025 単位の温度感受性アルカリ性フォスファターゼ（Life Technologies 社製）を添加し、 65°C で 15 分間反応させてベクターの XhoI 切断末端と NotI 切断末端の $5'$ 端を脱リン酸化した。該反応液に $10\mu\text{l}$ の反応停止液（酵素に添付のもの）を添加して反応を止め、フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿により回収した。このベクター $0.25\mu\text{g}$ に、上記で精製した cDNA を加えてエタノール沈殿を行い、回収したベクター DNA と cDNA をリガーゼ緩衝液 [100mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.6$)、 5mM MgCl_2 、 300mM NaCl] $4\mu\text{l}$ に溶解させ、ライ

ゲーションキット v e r . 1 (宝酒造社製) の B 液 $4 \mu\text{l}$ を添加して 26°C で 10 分間反応させ、ベクター DNA に c DNA を結合させた。該反応液を $4 \mu\text{l}$ ずつ λ phage Packaging Extract Gigapack β Gold (Stratagene 社製) を用いてパッケージングを行った。具体的試薬および方法は、キットに付与されているマニュアルに従った。得られたファージを大腸菌 X L 1 - B l u e M R F' 株に感染させてタイターを測定した。さらに、ファージをプレート上で増殖させた後に S M 緩衝液 (組成は Stratagene 社のマニュアルに記載) 中に回収することにより c DNA ライブラリーを 1 回増幅し、最終的な c DNA ライブラリーとした。タイターの測定およびライブラリー増幅の具体的な方法は、 λ ファージパッケージングキットに付与されているマニュアルに従った。

(2) プラークハイブリダイゼーションによる完全長 c DNA の取得

(1) において作製したライブラリーについて、プラークの DNA をナイロンメンブレン H y b o n d N + (Amersham Pharmacia Biotech 社製) にプロットした。鋳型として実施例 2 で得られたサブトラクションライブラリー由来のプラスミドを、プライマーとして各遺伝子特異的なものを合成し、P C R D I G ラベリング・ミックス (Boehringer Mannheim 社製) を添加して P C R を行い、各遺伝子特異的な断片を増幅し標識した。該 DNA 断片をプローブとして用い、Boehringer Mannheim 社のマニュアルに従ってハイブリダイゼーションおよび、ポジティブプラークの検出を行った。ポジティブプラークは S M 緩衝液中で増幅させ、ヘルパーファージ E x A s s i s t (Stratagene 社製) を用いてプラスミド化した。プラスミド化の具体的な方法は、Stratagene 社のマニュアルに従った。

(2) 塩基配列の決定

得られたそれぞれの c DNA クローンの塩基配列は、Perkin Elmer 社の 377 DNA シークエンサーを用いて決定した。塩基配列決定のための具体的試薬および方法はパーキンエルマー社のダイプライマーシーク

エンシング F S レディーリアクション (Dye Primer Cycle Sequencing FS Ready Reaction) キットを使用し、キットに添付のマニュアルに従った。また、この塩基配列を 3 フレームでアミノ酸配列に翻訳し、オープンリーディングフレーム (O R F) が存在するかどうか調べた。

(3) 完全長 c D N A の相同性解析

① A 4 R S - 0 0 2

ブランクハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローン p f A 4 R S - 0 0 2 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 4 3 に示した。クローン p f A 4 R S - 0 0 2 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (*Escherichia coli* DH5 α /pfA4RS-002-1) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 2 で国際寄託されている。A 4 R S - 0 0 2 の塩基配列中には、3 9 0 アミノ酸から成る O R F が観察され (配列番号 1 4 4 にアミノ酸配列を示した)、相同性解析の結果、免疫グロブリンファミリーに属する蛋白質と有意な相同性を示すことがわかった。その中でも特に、ヒト大腸癌の特異的マーカーである A 3 3 a n t i g e n [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 469 (1997)]、ウィルスの受容体蛋白質である C A R (Coxsackie and adenovirus receptor) [Science, 275, 1320 (1997)] と高い相同性を示した。これらの因子は、その一次構造から I 型の膜蛋白質であることが予測されている。アミノ酸配列から推定した親水性の解析から、A 4 R S - 0 0 2 のアミノ末端 2 9 残基が分泌シグナルと推定され、また、2 4 9 ~ 2 7 0 番目に疎水性の高い、膜貫通領域と考えられる配列が存在している。免疫グロブリンファミリーに属する I C A M - 1 や V C A M - 1 がずり応力依存的発現変動を示すことから、A 4 R S - 0 0 2 は免疫グロブリンファミリーに属し、膜蛋白質として機能していることが推測される。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンプロットを、図 2 のレーン 7 6、図

4 のレーン 2 1 に示した。

② A 4 R S - 0 4 9

ブランクハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローク p f A 4 R S - 0 4 9 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 4 5 に示した。クローク p f A 4 R S - 0 4 9 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (*Escherichia coli* DH5 α /pfA4RS-049-1) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 3 で国際寄託されている。A 4 R S - 0 4 9 の塩基配列中には、8 8 1 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 4 6 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 0 4 9 がコードする蛋白質は、マウス由来 3 B P - 1 (SH3 domain binding protein) [EMBL J., 14, 3127 (1995)] をはじめ、r h o G A P、A b r といった種々の GTPase-activating protein (G A P) と有意な相同性を示した。G A P とは、r a s、r a b といった低分子量 G T P 結合蛋白質の G T P a s e 活性を制御するファミリーで、A 4 R S - 0 4 9 が相同性を示したのは、r h o、r a c などの細胞骨格制御に関与すると考えられているサブファミリーに特異的な G A P である。A 4 R S - 0 4 9 がコードするアミノ酸配列中には、既知の G A P 間で保存されている G T P a s e 活性化ドメインが存在し、A 4 R S - 0 4 9 が G A P として機能することが推測される。また、データベース中には A 4 R S - 0 4 9 がコードする蛋白質と優位な相同性を示す、機能未知の線虫 [Accession: Z73425]、酵母 [Accession: Z97210] 由来の遺伝子が登録されており、A 4 R S - 0 4 9 が進化上よく保存された遺伝子であることが予想される。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンプロットを、図 2 のレーン 7 7、図 4 のレーン 2 2 に示した。

③ A 4 R S - 2 3 0

ブランクハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A ク

クローン p f A 4 R S - 2 3 0 - 2 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 4 7 に示した。クローン p f A 4 R S - 2 3 0 - 2 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (Escherichia coli DH5 α /pfA4RS-230-2) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 4 で国際寄託されている。

A 4 R S - 2 3 0 の塩基配列中には、3 2 2 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 4 8 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 2 3 0 がコードする蛋白質は、マウス myeloid upregulated protein [Accession: 035682] と 8 3 % の高い相同性を示し、ヒトカウンターパートとも考えられるが、C 末端側はかなり異なっている。マウス myeloid upregulated protein に関してはデータベース中に配列が登録されているだけで、機能は未知である。また、アミノ酸配列から推定される親水性の解析から、A 4 R S - 2 3 0 がコードする蛋白質は極めて疎水性が高く、膜蛋白質として機能している可能性もある。しかしながら、N 末端にシグナル配列と判断される配列は存在しない。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 8、図 4 のレーン 2 3 に示した。

④ A 4 R S - 2 3 9

ブランクハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローン p f A 4 R S - 2 3 9 - 2 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 4 9 に示した。クローン p f A 4 R S - 2 3 9 - 2 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (Escherichia coli DH5 α /pfA4RS-239-2) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 5 で国際寄託されている。

A 4 R S - 2 3 9 の塩基配列中には、6 6 3 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 5 0 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析

の結果、A 4 R S - 2 3 9 がコードする蛋白質は、上述の A 4 R S - 0 4 9 と同様、r h o G A P、A b r といった種々の G A P と、低いながらも有意な相同性を示した。ただし、A 4 R S - 2 3 9 と A 4 R S - 0 4 9 は別の D N A である。A 4 R S - 2 3 9 がコードするアミノ酸配列中には、既知の G A P 間で保存されている G T P a s e 活性化ドメインが存在し、A 4 R S - 2 3 9 が G A P として機能することが推測される。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 7 9、図 3 のレーン 2 4 に示した。

⑤ A 4 R S - 2 4 2

ブラックハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローン p f A 4 R S - 2 4 2 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 5 1 に示した。クローン p f A 4 R S - 2 4 2 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (Escherichia coli DH5 α /pfA4RS-242-1) はブタベスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 6 で国際寄託されている。A 4 R S - 2 4 2 の塩基配列中には、8 6 3 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 5 2 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 2 4 2 がコードする蛋白質のアミノ末端半分は、e h b 1 0 という遺伝子の産物のほぼ全長と一致している。しかし、A 4 R S - 2 4 2 のカルボキシ末端半分に相当する部分は e h b 1 0 には存在しない。即ち、両者はスプライシング・バリエーションであると考えられる。e h b 1 0 は、E p s 1 5 (E G F 受容体の基質) の蛋白質相互作用に関与すると考えられる E H ドメインと結合する因子として発現クローニングにより取得されたものの 1 つである [Genes & Dev., 11, 2239 (1997)] が、その機能は未知である。ただ、E H ドメインとの結合に必要とされるモチーフは A 4 R S - 2 4 2 にも存在している。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 8 0、図 4 のレーン 2 5 に

示した。

⑥ A 4 R S - 4 9 1

プラークハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローク p f A 4 R S - 4 9 1 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 5 3 に示した。クローク p f A 4 R S - 4 9 1 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (*Escherichia coli* DH5 α /pfA4RS-491-1) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 7 で国際寄託されている。A 4 R S - 4 9 1 の塩基配列中には、3 3 1 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 5 4 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 4 9 1 がコードする蛋白質は、ヒト hypothetical protein としてデータベースに登録されているアミノ酸配列 [Accession: 043334] と広い範囲にわたって一致していた。しかしながら、この hypothetical protein は 3 9 3 アミノ酸からなり、8 8 ~ 1 4 8 番目のアミノ酸が A 4 R S - 4 9 1 がコードするアミノ酸配列には含まれないことがわかった。即ち、両者はスプライシング・バリエーションであると考えられる。A 4 R S - 4 9 1 がコードする蛋白質は、線虫 [Accession: Z78198]、細菌 [Accession: E69827] 由来の glycerophosphodiester phosphodiesterase と顕著な相同性を示し、進化上よく保存された遺伝子であることがわかった。細菌由来の glycerophosphodiester phosphodiesterase は膜上に存在することが知られており、A 4 R S - 4 9 1 がコードするアミノ酸配列から推定した親水性の解析から、配列番号 1 5 4 の 1 ~ 2 6 番目のアミノ酸配列がシグナルペプチドと推定された。ズリ応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 8 1、図 4 のレーン 2 6 に示した。

⑦ A 4 R S - 5 7 8

プラークハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A ク

クローン p f A 4 R S - 5 7 8 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得られた塩基配列を配列番号 1 5 5 に示した。クローン p f A 4 R S - 5 7 8 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (*Escherichia coli* DH5 α /pfA4RS-578-1) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 8 で国際寄託されている。A 4 R S - 5 7 8 の塩基配列中には、5 4 1 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 5 6 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 5 7 8 がコードする蛋白質は、線虫由来の hypothetical protein として登録されている機能未知の蛋白質のアミノ酸配列 [Accession: Z95559] と最も強い相同性を示し、次いでラット brain finger protein (B F P) [Biochem. Biophys. Res. Commun., 240, 8 (1997)] と有意な相同性を示した。ラット B F P は、z i n c f i n g e r モチーフの一種である R I N G f i n g e r モチーフを有する新規遺伝子としてクローニングされ、脳特異的に発現すること、神経細胞への分化の段階で誘導発現される可能性が報告されている。しかしながら、A 4 R S - 5 7 8 がコードするアミノ酸配列中には、R I N G f i n g e r モチーフと判断される配列は存在しない。A 4 R S - 5 7 8 がコードする蛋白質はまた、種々の G T P 結合蛋白質と有意な相同性を示し、多くの G T P 結合蛋白質が共通して有している 3 つのモチーフのうち 2 つを A 4 R S - 5 7 8 も有している。モチーフ 2 つのみを有する G T P 結合蛋白質の存在も報告されており、A 4 R S - 5 7 8 がコードする蛋白質も G T P 結合蛋白質として機能している可能性が考えられる。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 8 2、図 4 のレーン 2 7 に示した。

⑧ A 4 R S - 8 2 9

ブラックハイブリダイゼーションの結果取得された完全長 c D N A クローン p f A 4 R S - 8 2 9 - 1 の c D N A の全塩基配列を決定し、得

られた塩基配列を配列番号 1 5 7 に示した。クローン p f A 4 R S - 8 2 9 - 1 を導入した大腸菌 D H 5 α 株 (Escherichia coli DH5 α /pfA4RS-829-1) はブタペスト条約下で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 3) に平成 11 年 8 月 5 日付けで受託番号 F E R M B P - 6 8 2 9 で国際寄託されている。A 4 R S - 8 2 9 の塩基配列中には、1 7 3 アミノ酸から成る O R F が観察された (配列番号 1 5 8 にアミノ酸配列を示した)。相同性解析の結果、A 4 R S - 8 2 9 がコードする蛋白質は、アラビドプシス [Accession: 048707]、線虫 [Accession: Q20340]、酵母 [Accession: Q03677]、由来の、h y p o t h e t i c a l p r o t e i n として登録されている機能未知の蛋白質のアミノ酸配列と顕著な相同性を示し、進化的によく保存された遺伝子であることがわかった。ずり応力依存的発現上昇を示すノーザンブロットを、図 2 のレーン 8 3、図 4 のレーン 2 8 に示した。

実施例 6

A 4 R S - 0 0 2 の組み換え蛋白質の生産

(1) 発現プラスミドの構築

実施例 5 において取得した 2 μ g の p f A 4 R S - 0 0 2 - 1 に 5 μ l の 1 0 反応用緩衝液 (酵素に添付のもの)、1 μ l の X h o I (1 0 単位 / μ l ; 宝酒造社製)、および蒸留水を添加して総容量を 5 0 μ l とした。3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間保温し、完全消化した。該反応液に 5 M N a C l を 0 . 5 μ l 、N o t I (1 0 単位 / μ l ; 宝酒造社製) 1 μ l を添加し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間保温して完全消化した。フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿を 2 0 μ l の蒸留水に溶解させた。ここに 3 μ l の 1 0 \times b l u n t i n g b u f f e r (酵素に添付のもの)、6 μ l の 2 . 5 m M d N T P 混合液、1 μ l の K l e n o w f r a g m e n t (宝酒造社製) を添加し、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間保温して制限酵素処理末端の平滑化を行った。

フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理の後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を $5\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解させ、S f i I リンカー (5'-CTTTAGAGCAC-3'、5'-CTCTAAAG-3') を各々 $0.4\mu\text{g}$ 、 $0.3\mu\text{g}$ 添加して $6\mu\text{l}$ とした。ここに、ライゲーションキット v e r. 2 (宝酒造社製) の I 液を $12\mu\text{l}$ 、II 液を $6\mu\text{l}$ 加えて 16°C で一晩保温し、リンカーライゲーションを行った。該反応液全量を 0.8% アガロースゲルで電気泳動し、目的の断片を QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて回収した。方法はキットに添付のマニュアルに従った。回収した DNA 断片を $10\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解した。このインサート DNA に、S f i I で線状化し同様にアガロースゲルから回収した動物細胞発現用プラスミドベクター p A M o [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平 05-336963 号公報)] をモル比でインサートの $1/5$ 量になるように加え、該溶液と等容量の L i g a t i o n H i g h (東洋紡績社製) を添加した。 16°C で 3 時間保温し、リンカー付きインサートとベクターの連結を行った後、コンピテントセル大腸菌 MW 294 に導入した。導入後の菌液を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地にまき、 37°C で終夜保温してコロニーを形成させた。得られたコロニーをランダムに拾ってプラスミドを取得し、制限酵素処理によりインサートの有無を確認した。インサートが入っていたものについてその方向を調べ、望むべき方向性を有する 1 クローン、p A M o - 002 について QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社製) を用いプラスミドの大量調製を行った。方法はキットに添付のマニュアルに従った。このプラスミドを無菌的にエタノール沈殿し、蒸留水に溶解させて $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。以上の p A M o - 002 の構築については図 5 に示した。

(2) 組み換え体プラスミドの動物培養細胞への導入

遺伝子発現用の宿主細胞である N a m a l w a K J M - 1 [Cytotechnology, 1, 151 (1988)] を遠心分離して集め、 10ml

のK-PBS [13.7 mM KCl、0.27 mM NaCl、0.81 mM Na_2HPO_4 、0.15 mM KH_2PO_4 、0.4 mM MgCl_2] で洗浄した後、冷却したK-PBSに懸濁して 8×10^6 細胞/mlになるように調製した。該細胞懸濁液200 μl (1.6×10^6 細胞)と、(1)で調製した4 μl (4 μg) のプラスミドDNAを混合し、あらかじめ氷上で冷却しておいたチャンバー (BIO-RAD 社製) に速やかに移した後、Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いて0.35 kV、125 μF の電圧を負荷してエレクトロポレーションを行った。その後速やかにチャンバーを氷上に置き、8 ml のRPMI 1640培地 (日水製薬社製) を入れておいたフラスコにエレクトロポレーション後の細胞を移した。37℃、5% CO_2 の条件下で24時間培養した後、選択用の薬剤であるG-418を最終濃度0.5 mg/mlになるように添加した。さらに1週間、培養を続けて遺伝子導入細胞を選択した。コントロールとして、インサートの入っていないpAMoベクターのみをKJM-1に導入した細胞も調製した。

実施例 7

完全長 cDNA のクローン化 (2)

実施例 5 の場合と同様、サブトラクションライブラリーから得られた新規部分 cDNA 断片 3 種類について、ヒト脂肪組織あるいはKato III 由来完全長 cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を取得した。

(1) ヒト脂肪組織およびKato III細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの作製

ヒト脂肪組織より、文献 [J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989] 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでポリ (A) ⁺ RNA を精製した。

同様に、Kato III細胞より、文献 [J. Sambrook, E. F. Fritsch &

T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989] 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ d T セルロースでポリ (A) + RNA を精製した。

それぞれのポリ (A) + RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)] により c DNA ライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号: 1 6 2) および Oligo d T primer (配列番号: 1 6 3) を用いて文献 [鈴木・菅野, 蛋白質核酸酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki, Gene, 200: 149-156 (1997)] に記載の方法に従って、B A P (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、T A P (Tabacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 c DNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' 末端側のセンスプライマー (配列番号: 1 6 4) と 3' 末端側のアンチセンスプライマー (配列番号: 1 6 5) の 2 種のプライマーを用いる P C R により二本鎖 c DNA に変換し、S f i I で切断した。なお、この P C R は、市販の GeneAmp XL PCR キット (Perkin Elmer 社製) を使用して、9 5 °C で 5 分間熱処理後、9 5 °C で 1 分間、5 8 °C で 1 分間および 7 2 °C で 1 0 分間の反応サイクルを 1 2 回繰り返す、その後 4 °C で保持することにより行った。次いで、D r a I I I で切断したベクター pME18SFL3 [Accession: AB009864、発現ベクター, 3392bp] に c DNA の方向性を決めてクローニングし、c DNA ライブラリーを作製した。

(2) 全長 c DNA 配列の決定

(1) で取得された c DNA ライブラリーから得たクローンのプラスミド DNA について、GSP-1 Genome Priming System (N E B 社製) を用い、試験管内で c DNA クローンにトランスポゾン (以下 T n と略記) 転位反応を行った。T n 供与体には p G P S 1 . 1 (N E B 社製) を用いた。T n 転位反応後の DNA 試料の一部をとり、大腸菌の形質転換を行い、各 c DNA クローンについて、通常それぞれ 1 6 クローンの T n 挿入クローンを拾った。これらより得たクローンのプラスミド DNA に

ついて、Primer N（配列番号：166）、Primer S（配列番号：167）をそれぞれプライマーとして実施例5の場合と同様に全長cDNA配列を決定した。

（3）ずり応力依存的発現上昇を示す完全長新規遺伝子

実施例3においてサブトラクションライブラリーから取得されたA4RS-011の配列をクエリーとし、BLAST[Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402 (1997)]プログラムを用いて（2）で取得されたcDNA配列に対して検索を行ったところ、C-KAT07969（配列番号：168）と一致した。このcDNA配列のORFの中でもっとも長い翻訳アミノ酸をC-KAT07969のcDNA配列がコードするアミノ酸配列（121-1062配列番号：169）とした。このアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存性発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のパネル56に示した。

実施例3においてサブトラクションライブラリーから取得されたA4RS-604の配列をクエリーとし、BLASTプログラムを用いて

（2）で取得されたcDNA配列に対して検索を行ったところ、C-ADKA02341の配列（配列番号：170）と一致した。この配列はH.sapiens mRNA for myosin-I betaの配列[Accession: X98507]の一部と一致する。このcDNA配列のORFの中でもっとも長い翻訳アミノ酸をC-ADKA02341のcDNA配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：171）とした。ずり応力依存性発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のパネル64、図4のパネル18に示した。

実施例3においてサブトラクションライブラリーから取得されたA4RS-619の配列をクエリーとし、BLASTプログラムを用いて

（2）で取得されたcDNA配列に対して検索を行ったところ、C-hep01279の配列（配列番号：172）と一致した。このcDNA

配列のORFの中でもっとも長い翻訳アミノ酸をC-h e p 0 1 2 7 9のcDNA配列がコードするアミノ酸配列(配列番号:173)とした。このアミノ酸配列は、他の既知のタンパク質と顕著な相同性を示さない。ずり応力依存性発現上昇を示すノーザンブロットを、図2のパネル66に示した。

実施例 8

A4RS-041のアポトーシス抑制活性の検出

サブトラクシオンライブラリーより得られた、ずり応力依存性発現上昇を示す遺伝子の機能を調べるため、Fasを介したアポトーシスを抑制する遺伝子LFGと相同性を有する、機能未知の遺伝子、A4RS-041に関して、以下の実験を行った。

(1) 組換えウィルスベクターの作製

全長型A4RS-041(配列番号7)を有するプラスミドを鋳型とし、A4RS-041の蛋白質をコードするcDNA配列の部分をPCRにより特異的に増幅させた。即ち、PCRチューブに、20ngの鋳型プラスミドDNA、HindIII部位を付加した5'末端側のセンスプライマー(配列番号:174)25pmol、ClaI部位を付加した3'末端側のアンチセンスプライマー(配列番号:175)25pmol、10×反応緩衝液(酵素に添付のもの)5μl、2mM dNTP溶液5μl、0.5μlのKOD DNA polymerase (2.5units/μl; 東洋紡績社製)を混合し、ここに滅菌水を加えて50μlになるようにした。98℃で15秒間、65℃で2秒間、74℃で30秒間のサイクルを25回繰り返すことによりcDNAの増幅を行った。得られた全長型A4RS-041の増幅断片の末端ををHindIIIとClaIで切断して精製し、あらかじめHindIIIとClaIで切断しておいたウィルスベクターpCLNCX (IMGENEX社製)と連結させた。その結果、CMVプロモータによりA4RS-04

1 の発現が誘導される組換えウィルスベクター p C L N C 0 4 1 が造成された。得られた組換えウィルスベクター p C L N C 0 4 1 に関して、その挿入断片部分の塩基配列を決定し、P C R による塩基置換が生じていないことを確認した。対照として、E G F P (enhanced green fluorescent protein; Clontech 社製) を同様に p C L N C X の H i n d I I I、C l a I 部位に挿入した p C L N C G F P も造成した。



(2) A 4 R S - 0 4 1 を安定に高発現する H e L a 細胞の取得

(1) で構築した組換え型ウィルスベクターをウィルス産生用の 2 9 3 細胞に導入することにより、組換えウィルスの生産を行った。p C L N C 0 4 1、および p C L N C G F P の 2 9 3 細胞へのトランスフェクションには T r a n s F a s t (Promega 社製) を使用した。方法は添付のマニュアルに従った。また、ウィルスの産生方法、H e L a 細胞への感染方法は、使用したウィルスベクター (IMGENEX 社製) に添付のマニュアルに従った。

感染から 2 日後、H e L a 細胞に $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 (Life Technologies 社製) を添加し培養を継続する事で、感染されなかった細胞を選択的に排除した。この操作により、A 4 R S - 0 4 1 あるいは G F P を安定に高発現する H e L a 細胞の形質転換体を取得した。

(3) 細胞死抑制活性の検出

(2) で取得された安定形質転換体の H e L a 細胞 (A 4 R S - 0 4 1、および対照として G F P を発現する H e L a 細胞の安定形質転換体) に $100 \text{ ng}/\text{ml}$ の抗 F a s モノクローナル抗体 C H - 1 1 (M B L 社製) を添加しアポトーシスを誘導した。誘導開始から 2 4、3 6、4 8 時間後の細胞の生存率をトリパンブルー染色法により測定した。この際、浮遊細胞と接着細胞の両方を合わせて生存率を測定した。実験はすべて 2 連で行い、平均値と標準偏差を示した。結果を図 6 A に示した。また、抗体の濃度を 1 0、5 0、1 0 0、5 0 0 ng/ml と変化させたときの 3 6 時間後の細胞の生存率も測定した。その結果を図 6 B に示す。A

4 R S - 0 4 1 が導入された H e L a 細胞（図 6 中、 で表示）では、対照である G F P が導入された H e L a 細胞（図 6 中、 で表示）と比較して、いずれの点においても有意に生存率が増加していた。即ち、A 4 R S - 0 4 1 は、少なくとも H e L a 細胞において、F a s を介したアポトーシスを抑制する活性を有することがわかった。

実施例 9

A 4 R S - 0 4 1 の発現分布の解析

実施例 8 においてアポトーシス抑制活性の見出された A 4 R S - 0 4 1 のヒト組織における発現部位を調べる目的から、以下の実験を行った。

(1) ヒト正常組織における A 4 R S - 0 4 1 の発現解析

A 4 R S - 0 4 1 に特異的なプライマー（配列番号 1 7 6、1 7 7）、および P C R D I G ラベリング・ミックス（Boehringer Mannheim 社製）を用い、実施例 2 において得られた A 4 R S - 0 4 1 を有するプラスミドを鋳型として P C R を行うことで、D I G 標識された A 4 R S - 0 4 1 特異的断片を調製した。該 D N A 断片をプローブとして、8 種類のヒト組織由来 R N A がプロットされた Human Multiple Tissue Northern Blot（Clontech 社製）に対してハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、D I G 発光検出キット（Boehringer Mannheim 社製）を用いて化学発光によるシグナルの検出を行った。方法は、キットに添付のマニュアルに従った。図 7 のパネル A に示したように、A 4 R S - 0 4 1 特異的なシグナルが約 2.5 k b 付近に検出された。レーン 1 ~ 8 にはそれぞれ脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、脳、心臓由来のポリ（A）+ R N A を 2 μ g ずつ泳動してある。シグナルは全てのレーンに観察されたが、レーン 7 の脳ではシグナルは弱く、A 4 R S - 0 4 1 の発現は、脳では相対的に低いことがわかった。一方、L F G の発現は脳で非常に高く抹消で低いことが報告されており [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 22, 12673-12678, (1999)]、A 4 R S - 0 4 1 と L F G が組織特異的に機能

していることが示唆された。

(2) ヒト血管内皮細胞、脳における A 4 R S - 0 4 1、L F G の発現調査

実施例 2 において取得した H U V E C (ずり応力を負荷しないもの) 由来ポリ (A) + R N A、あるいはヒト脳由来ポリ (A) + R N A (Clontech 社製) それぞれ 1 μ g を鋳型とし、Superscript Preamplification System (Life Technologies 社製) を用いて 1 本鎖 c D N A の合成を行った。方法はキットに添付されたマニュアルに従った。最終的に得られた c D N A 溶液は 5 m l にまで希釈して P C R に使用した。これらの c D N A を鋳型として、A 4 R S - 0 4 1 (配列番号 1 7 6、1 7 7)、L F G (配列番号 1 7 8、1 7 9)、G 3 P D H (配列番号 1 8 0、1 8 1) それぞれに特異的なプライマーを用いて P C R を行った。反応液は c D N A 溶液 5 μ l、1 0 \times 反応用緩衝液 (酵素に添付のもの) 2 μ l、2 . 5 m M d N T P 溶液 1 . 6 μ l、dimethyl sulfoxide 1 μ l、センス、アンチセンスプライマーそれぞれ 1 0 p m o l、GeneTaq DNA polymerase (5 units / μ l ; ニッポンジーン社製) 0 . 1 μ l を含み、ここに滅菌水を加えて総容量が 2 0 μ l になるようにした。9 4 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱して鋳型とプライマーを変性させた後、9 4 $^{\circ}$ C 1 分間、6 0 $^{\circ}$ C 1 分間、7 2 $^{\circ}$ C 1 分間のサイクルを繰り返した。サイクル数は、A 4 R S - 0 4 1、L F G に関しては 3 3 サイクル、G 3 P D H に関しては 2 4 サイクルで行った。7 2 $^{\circ}$ C で 1 0 分保温した後、4 $^{\circ}$ C に冷却した。得られた P C R 産物の半量を 1 . 8 % アガロース電気泳動に供した。その結果を図 7 のパネル B に示した。レーン 1 にはサイズマーカーとして 1 0 0 b p ラダー (Life Technologies 社製) を泳動してある。レーン 2、4、6 には H U V E C 由来 c D N A、レーン 3、5、7 にはヒト脳由来 c D N A を用いたときの P C R 産物を泳動してある。また、レーン 2 と 3 は A 4 R S - 0 4 1 特異的プライマー、レーン 4 と 5 は L F G 特異的プライマー、レーン 6 と 7 は G 3 P D H 特異的プライマーを用いたとき

のPCR産物を泳動してある。

A4RS-041は、HUEC（レーン2）、脳（レーン3）の両方でバンドが増幅され、両者で発現していることが確認された。発現量はHUECに比べると、脳では低い傾向がみられた。一方、LFGは、脳では非常に強く発現している（レーン5）が、HUECでは全くバンドが増幅されておらず（レーン4）、発現していないことがわかった。

以上の結果から、内皮細胞においてアポトーシス抑制に関与する因子は、LFGではなくA4RS-041であると考えられた。

また、A4RS-041とLFG（ヒト由来）のアミノ酸配列の相同性を図8に示した。両者は、互いに48.9%（152/311）の同一性を有する相似蛋白質と判断されたが、N末側の約3分の1にあたる部分については、相同性がかなり低いことがわかった。

配列表フリーテキスト

配列番号159-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号160-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号161-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号162-人工配列の説明:オリゴキャップリンカー配列

配列番号163-人工配列の説明:オリゴdTプライマー配列

配列番号164-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号165-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号166-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号167-人工配列の説明:人工合成プライマー配列

配列番号174-人工配列の説明:合成DNA

配列番号175-人工配列の説明:合成DNA

配列番号176-人工配列の説明:合成DNA

配列番号177-人工配列の説明:合成DNA

配列番号178-人工配列の説明:合成DNA

配列番号 1 7 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 1 8 0-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 1 8 1-人工配列の説明：合成 DNA

請求の範囲

1. 配列番号 1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 6 8、1 7 0 および 1 7 2 で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する DNA。
2. 配列番号 1 4 3、1 4 5、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 6 8、1 7 0 および 1 7 2 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性 DNA。
3. 配列番号 1 4 7 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズしかつ該 DNA と 9 0 % 以上の相同性を有するずり応力応答性 DNA。
4. 配列番号 1 4 3、1 4 5、1 4 9、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 6 8、1 7 0 および 1 7 2 で表わされる塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した 5 ～ 6 0 塩基と同じ配列を有する DNA または該 DNA と相補的な配列を有する DNA。
5. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を用いてずり応力応答性遺伝子の mRNA を検出する方法。
6. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。
7. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を用いて動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法。
8. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を用いてずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。
9. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。
- 1 0. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。
- 1 1. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含む組換えウイルスベクター。

12. 請求項1～4のいずれか1項に記載のDNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクター。

13. 配列番号111、113、115、116、117、119、121、123、125、127、129、130、131、132、133、134、135、137、139および141で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNA。

14. 請求項13記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするずり応力応答性DNA。

15. 配列番号111、113、115、116、117、119、121、123、125、127、129、130、131、132、133、134、135、137、139および141で表わされる塩基配列から選ばれる塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNA。

16. 請求項13～15のいずれか1項に記載のDNAを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

17. 請求項13～15のいずれか1項に記載のDNAを用いる、動脈硬化の原因遺伝子を検出する方法。

18. 請求項13～15のいずれか1項に記載のDNAを用いてずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

19. 請求項13～15のいずれか1項に記載のDNAを用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

20. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する

DNAを用いて、ずり応力応答性遺伝子のmRNAを検出する方法。

21. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAを用いて、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写量を検出することにより細胞のアポトーシス感受性を同定する方法。

22. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、あるいはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを用いて、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写もしくは翻訳を調節することにより細胞のアポトーシスを抑制または促進する方法。

23. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

24. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAを含有する、細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤。

25. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する

DNAを用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

26. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

27. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの内在性の転写もしくは翻訳を調節することにより細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤を、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAを用いてスクリーニングする方法。

28. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107および109で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

29. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNAまたは配列番号7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNA、あるいはこれらの各DNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAを含有する、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤。

30. 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、

2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、
4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、
6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、
8 7、8 9、9 1、9 3、9 5、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、
1 0 7 および 1 0 9 で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する
DNAを含む組換えウイルスベクター。

3 1. 配列番号 1、3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、
2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、
4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、
6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、
8 7、8 9、9 1、9 3、9 5、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、
1 0 7 および 1 0 9 で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有する
DNAのセンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベ
クター。

3 2. 請求項 3 0 または 3 1 記載の組換えウイルスベクターを含有する、
動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

3 3. 配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えウイ
ルスベクターまたは配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNAのセ
ンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクターを用
いて細胞のアポトーシスを抑制する方法。

3 4. 配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNAを含む組換えウイ
ルスベクターまたは配列番号 7 で表される塩基配列を有するDNAのセ
ンス鎖と相同な配列からなるRNAを含む組換えウイルスベクターを用
いて細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングす
る方法。

3 5. 配列番号 1 4 4、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 2、1 5 4、1
5 6、1 5 8、1 6 9、1 7 1 および 1 7 3 で表されるアミノ酸配列か
ら選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質。

36. 請求項35記載の蛋白質の有するアミノ酸配列とは1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病変の形成に関与する活性を有する蛋白質。

37. 請求項35または36記載の蛋白質をコードするDNA。

38. 請求項1～4および37のいずれか1項記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

39. 請求項38記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

40. 請求項39記載の形質転換体を培地に培養し、培養液中に請求項35または36記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

41. 請求項39記載の形質転換体を培地に培養し、該培養物を用いて動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

42. 請求項35または36記載の蛋白質を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

43. 請求項35または36記載の蛋白質を生産する組換えウイルスベクター。

44. 請求項43記載の組換えウイルスベクターを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

45. 請求項35または36記載の蛋白質を認識する抗体。

46. 請求項45記載の抗体を用いる請求項35または36記載の蛋白質の免疫学的検出方法。

47. 請求項45記載の抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

48. 請求項45記載の抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を調節する薬剤をスクリーニングする方法。

49. 請求項45記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

50. 請求項45記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

51. 請求項45記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導するドラッグデリバリー法。

52. 配列番号112、114、118、120、122、124、126、128、136、138、140または142で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体。

53. 請求項52記載の抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

54. 請求項52記載の抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制する薬剤をスクリーニングする方法。

55. 請求項52記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

56. 請求項52記載の抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

57. 請求項52記載の抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導するドラッグデリバリー法。

58. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と特異的に結合し細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤を、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を用いてスクリーニングする方法。

59. 配列番号7で表される塩基配列を有するDNA、または配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを、宿主細胞に導入して得られる形質転換体を培地に培養し、該培養物を用いて細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法。

60. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、

22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108および110で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白を生産する組換えウイルスベクター。

61. 請求項60記載の組換えウイルスベクターを含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

62. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターを用いて、細胞のアポトーシスを抑制する方法。

63. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する組換えウイルスベクターを含有する、細胞のアポトーシスを抑制する薬剤。

64. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬をスクリーニングする方法。

65. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、ずり応力応答性遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制または促進する薬剤をスクリーニングする方法。

66. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞のアポトーシスを調節する方法。

67. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、細胞のアポトーシスを調節する薬剤をスクリーニングする方法。

68. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を用いて、配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の発現量を検出することにより細胞のアポトーシス感受性を同定する方法。

69. 細胞が血管内皮細胞である請求項21、22、27、33、34、58、59、62、66、67、または68のいずれか1項に記載の方法。

70. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の診断薬。

71. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、細胞のアポトーシス感受性を同定する薬剤。

72. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含有する、動脈硬化を原因とする血管病の治療薬。

73. 配列番号8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗

体を含む、細胞のアポトーシスを調節する薬剤。

74. 請求項27、34、58、59または67のいずれか1項に記載の方法により得られる、細胞のアポトーシスを抑制または促進する薬剤。

75. 細胞が血管内皮細胞である請求項24、29、63、71、73、または74のいずれか1項に記載の薬剤。

76. 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108または110で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体と放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導するドラッグデリバリー法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/435, 16/18, C12P21/02,
C12Q1/68, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P9/10,
G01N33/50, 33/53,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/11-15/62, C07K14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|----------------------------------|
| X | WO, 99/14327, A2 (GENENTECH, INC.), 25 March, 1999 (25.03.99), especially, PRO246, FIG.26 (Accession No.X28436), FIG.27 (Accession No.Y05286) & AU, 9893121, A & ZA, 9808293, A | 2,4,11,12, 36-40,43, 45,46 |
| X | WO, 99/14328, A2 (GENENTECH, INC.), 25 March, 1999 (25.03.99), especially, FIGURE 16 (Accession No.X52221), FIGURE 17 (Accession No.Y13351) & ZA, 9808460, A & AU, 9893178, A & EP, 1027434, A2 | 2,4,11,12, 36-40,43, 45,46 |
| X | US, 5942606, A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 24 August, 1999 (24.08.99), especially, SEQ ID NO:2 (Accession No.X87000), SEQ ID NO:1 (Accession No.Y27096) (Family: none) | 2,4,11,12, 36-40,43, 45,46 |
| P,X | WO, 99/58660, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 18 November, 1999 (18.11.99), | 2,4,11,12, 36-40,43, |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

"A" Special categories of cited documents:
document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06840

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|----------------------------------|
| | especially, SEQ ID NO:39 (Accession No.Z65278), SEQ ID NO:291 (Accession No.Y76303) & AU, 9938831, A | 45,46 |
| P,X | WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC.), 02 March, 2000 (02.03.00), especially, SEQ ID NO:37 (Accession No.A23441), SEQ ID NO:38 (Accession No.Y94999) & AU, 9957847, A | 2,4,11,12, 36-40,43, 45,46 |
| P,X | WO, 00/15666, A2 (GENENTECH, INC.), 23 March, 2000 (23.03.00), especially, FIGURE 15 (Accession No.A30052), FIGURE 16 (Accession No.Y88574) & AU, 9958167, A | 2,4,11,12, 36-40,43, 45,46 |
| A | TOPPER, James N. et al., "Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype", Molecular Medicine Today, January, 1999, Volume 5, Number 1, pages 40-46 | 1,2,4-12, 35-50 |
| A | ANDO, Joji et al., "Flow-dependent Regulation of Gene Expression in Vascular Endothelial Cells", Japanese Heart Journal, January, 1996, Volume 37, Number 1, 19-32 | 1,2,4-12, 35-50 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06840

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22,33,51,57,66,69,76

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 22, 33, 66 and 69 relate to "methods for inhibiting, promoting or controlling cell apoptosis". As stated in the description, these methods are performed for therapy in the human body. Therefore, these inventions pertain to methods for treatment of the human body by therapy. The inventions as set forth in claims 51, 57 and 76 relate to "drug delivery methods for inducing a fused antibody comprising an antibody bonded to a drug into arteriosclerotic focus" which are to be performed in the human body in therapy. Therefore, these inventions pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

The inventions as set forth in claims which relate to the base sequence represented by SEQ ID NO:143 or the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:144

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06840

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The requirement of unity of invention in international application (PCT Rule 13.1) is not satisfied unless there is a technical relationship between a group of inventions as set forth in claims involving one or more of the same or corresponding special technical feature. The term "special technical feature" means a technical feature clearly showing the contribution achieved by the inventions as set forth in the claims as a whole (PCT Rule 13.2). The requirement of unity of invention is judged without considering whether the group of inventions are described in separate claims or in a single claim in the alternative form (PCT Rule 13.3).

In the present case, the inventions relating to the base sequences represented by SEQ ID NOS: 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170, 172, 111, 113, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 135, 137, 139, 141, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107 and 109 (or the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 169, 171, 173, 112, 114, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 136, 138, 140, 142, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 and 110) or the base sequences represented by SEQ ID NO:115,116, 129, 130, 131, 132, 133 and 134 have a matter in common "DNA the expression of which is induced by a shear stress stimulus in hemoendothelial cells". However, there had been publicly known endothelin-1, monocyte chemotactic protein-1, etc. as "DNA the expression of which is induced by a shear stress stimulus in hemoendothelial cells", as the applicant recognizes. Therefore, it can be concluded that there is no "special technical feature" common to the inventions relating to the above-described base sequences (or amino acid sequences) as set forth in the claims.

Such being the case, the claims involve 86 separate inventions respectively relating to the base sequences represented by SEQ ID NOS: 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170, 172, 111, 113, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 135, 137, 139, 141, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107 and 109 (or the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 169, 171, 173, 112, 114, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 136, 138, 140, 142, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 and 110) or the base sequences represented by SEQ ID NO:115,116, 129, 130, 131, 132, 133 and 134.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/435, 16/18, C12P21/02,
C12Q1/68, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P9/10,
G01N33/50, 33/53,

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/11-15/62, C07K14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------------------------|
| X | WO, 99/14327, A2 (GENENTECH, INC.) 25.3月.1999 (25.03.99) 特に、PRO246, FIG. 26 (Accession No. X28436), FIG. 27 (Accession No. Y05286) & AU, 9893121, A & ZA, 9808293, A | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |
| X | WO, 99/14328, A2 (GENENTECH, INC.) 25.3月.1999 (25.03.99) 特に、FIGURE 16 (Accession No. X52221), | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|---------------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| | FIGURE 17 (Accession No. Y13351) & ZA, 9808460, A & AU, 9893178, A & EP, 1027434, A2 | |
| X | US, 5942606, A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 24.8月.1999 (24.08.99) 特に、SEQ ID NO:2 (Accession No. X87000), SEQ ID NO:1 (Accession No. Y27096) (ファミリーなし) | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |
| P, X | WO, 99/58660, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 18.11月.1999 (18.11.99) 特に、SEQ ID NO:39 (Accession No. Z65278), SEQ ID NO:291 (Accession No. Y76303) & AU, 9938831, A | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |
| P, X | WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC.) 2.3月.2000 (02.03.00) 特に、SEQ ID NO:37 (Accession No. A23441), SEQ ID NO:38 (Accession No. Y94999) & AU, 9957847, A | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |
| P, X | WO, 00/15666, A2 (GENENTECH, INC.) 23.3月.2000 (23.03.00) 特に、FIGURE 15 (Accession No. A30052), FIGURE 16 (Accession No. Y88574) & AU, 9958167, A | 2, 4, 11, 12, 36-40, 43, 45, 46 |
| A | TOPPER, James N. et al., "Blood flow and vascular gene ex- pression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype", Molecular Medicine Today, January, 1999, Volume 5, Number 1, pages 40-46 | 1, 2, 4-12, 35-50 |
| A | ANDO, Joji et al., "Flow-dependent Regulation of Gene Ex- pression in Vascular Endothelial Cells", Japanese Heart Journal, January, 1996, Volume 37, Number 1, 19-32 | 1, 2, 4-12, 35-50 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 22, 33, 51, 57, 66, 69, 76 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 22, 33, 66, 69 の発明は「細胞のアポトーシスを抑制、促進または調節する方法」に関するものであるが、明細書にも記載されているように、これらはヒトの体内で治療を目的として実施されるものであるから、これらの発明は人の身体の治療による処置方法に該当する。また、請求の範囲 51, 57, 76 の発明は、「抗体と
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT 規則 13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT 規則 13.2)。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる (PCT 規則 13.3)。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲に記載された配列番号 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170, 172, 111, 113

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲中の配列番号 143 で表される塩基配列又は配列番号 144 で表されるアミノ酸配列に関連した発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第I欄1. の続き

薬剤とを結合させた融合抗体を動脈硬化巣へ誘導する「ドラッグデリバリー法」に関するものであり、ヒトを治療する際に体内で実施されるものであるから、人の身体の治療による処置方法に該当する。

第II欄の続き

, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 135, 137, 139, 141, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109で表される塩基配列（若しくは、配列番号144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 169, 171, 173, 112, 114, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 136, 138, 140, 142, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110で表されるアミノ酸配列）、又は、配列番号115, 116, 129, 130, 131, 132, 133, 134で表される塩基配列、のそれぞれに関連した発明に共通する事項は、「血管内皮細胞においてずり応力刺激により発現が誘導されるDNA」ということである。しかしながら、「血管内皮細胞においてずり応力刺激により発現が誘導されるDNA」としては、出願人も認識しているように endothelin-1 や monocyte chemotactic protein-1 などが既に公知であったから、請求の範囲に記載された上記各塩基配列（又は、アミノ酸配列）に関連した発明に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

したがって、請求の範囲には、配列番号143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 168, 170, 172, 111, 113, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 135, 137, 139, 141, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109で表される塩基配列（若しくは、配列番号144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 169, 171, 173, 112, 114, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 136, 138, 140, 142, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110で表されるアミノ酸配列）、又は、配列番号115, 116, 129, 130, 131, 132, 133, 134で表される塩基配列、のそれぞれに関連した別異の86発明が包含されている。